

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PKOS MODELİNDE METFORMİN VE RESVERATROLÜN SIÇAN
OVARYUMU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

Selenay Hümeysra FURAT RENÇBER

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. F. Süreyya CEYLAN
2.Danışman: Doç. Dr. E. Elif GÜZEL MEYDANLI

Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir
Proje Numarası:2015/30
Etik Kurul Onay Numarası: KOÜHADYEK7/8-2015

KOCAELİ
2016

KABUL ve ONAY

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

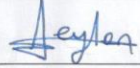
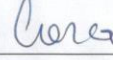
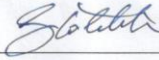
(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Deneysel PKOS Modelinde Metformin ve Resveratrolün Sıçan Ovaryumu Üzerindeki Etkilerinin Farklı Yöntemlerle İncelenmesi

Tez yazarı: H.Selenay FURAT RENÇBER
Tez savunma tarihi: 28.06.2016

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Süreyya CEYLAN-Doç.Dr.Elif GÜZEL MEYDANLI

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bilim uzmanlığı tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Prof.Dr.Süreyya CEYLAN	
Üye	Prof.Dr.Süheyla GONCA	
Üye	Doç.Dr.Sibel KÖKTÜRK	
Üye	
Üye	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ETİK KURUL



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2015 /30 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Deneysel PCOS Modelinde Metformin ve Resveratrolün Siçan Ovaryumu Üzerindeki Etkilerinin Farklı Yöntemlerle İncelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN /KOU Tıp Fak Histoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Arş. Gör. Selenay Hümeyra FURAT RENÇBER, Fatma Ceyla ERALDEMİR, Arş. Gör. Sema KURNAZ, Arş. Gör. Tuğba KUM, Yüks. Lis. Öğr. Zehra SEZER

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	x
------------------------------	--------------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır.	
	KARAR NO: KOU HADYEK 7/8-2015	KARAR TARİHİ: 09.07.2015

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Hayvanlar Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU Deneysel Hayvanlar Araştırma Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

ÖZET

Deneysel PKOS Modelinde Metformin ve Resveratrolün Sıçan Ovaryumu Üzerindeki Etkilerinin Farklı Yöntemlerle İncelenmesi

Amaç: PKOS (Polikistik Over Sendromu), üreme çağındaki kadınlarda en yaygın görülen endokrin ve metabolik bozukluktur. Resveratrolün antioksidant ve antiinflamatuvar özellikleri bulunmaktadır. Metformin ise Tip II diyabet tedavisinde kullanılan insulinduyarlaştırıcı bir ilaçtır. Bu çalışmanın amacı PKOS tedavisinde resveratrolün tek başına ve metforminle birlikte ovaryum üzerine etkisini biyokimyasal, immünohistokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik açılarından incelemektir.

Yöntem: Wistar albino ırkı dişi sıçanlar kontrol ve PKOS grubu olarak ikiye ayrıldı. PKOS modeli oluşturulan sıçanlar daha sonra randomize gruplara ayrıldı. Bu gruplara resveratrol, metformin ve iki tedavinin kombinasyonu uygulandı. Deney sonunda ovaryum dokuları ışık ve elektron mikroskopik olarak incelendi. SIRT1 ve AMPK immünreaktivitesi tespit edildi. Alınan kan örneklerinde FSH, LH, Testosteron, AMH, TNF- α ve MDA seviyeleri ölçüldü. Elde edilen veriler SPSS programı ile istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: PKOS grubunda vücut ve ovaryum ağırlığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdi. Gruplar arasında FSH seviyesi açısından anlamlı bir farklılık görülmedi ancak serum LH ve Testosteron seviyelerinin kontrol grubuna göre PKOS grubunda anlamlı arttığı tespit edildi. Tedavi grupları ise bu hormon seviyelerini iyileştirdi. AMH, TNF- α ve MDA, PKOS grubunda kontrole göre anlamlı artış gösterdi. SIRT1 ve AMPK immünreaktivitesi en fazla tedavi gruplarında saptandı. Histomorfometrik analizler PKOS grubunun kontrol ve tedavi grubuna kıyasla çok sayıda kistik ve atretik folikül içerdiğini gösterdi. Apoptotik indeks ve elektron mikroskopik incelemeler de bu bulguları destekledi.

Tartışma: Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında PKOS'un ovaryumda meydana getirdiği patolojik değişimlerde resveratrol ve metformin uygulamasının morfolojik, biyokimyasal veriler ve ultrastrüktürel yapı üzerine iyileştirici etkisi olduğu tespit edilmiştir. PKOS'un dünyadaki kadınların % 5-10'unu etkilediği göz önüne alındığında; önemli infertilite nedeni sayılan bu hastalıkta özellikle kombine tedavinin umut vaat ettiğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: PKOS, Resveratrol, Metformin, Oksidatif stres, İnflamasyon

ABSTRACT

Examinations of Resveratrol and Metformin's Effects on Rat Ovary in an Experimental PCOS Model via Different Methods.

Objectives: Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine-metabolic disorder among women in reproductive ages. Resveratrol has anti-oxydant and anti-inflamatuar properties. Metformin is an insuline-sensitizer that is used for the treatment of type 2 diabetes. The aim of this study is to investigate the effect of resveratrol and metformin on ovarian PKOS treatment.

Material-Method: Wistar albino rats were divided into two groups as control and PCOS. PCOS rats were randomly seperated into treatment groups and resveratrol, metformin and resveratrol-metformin combine therapy were performed. Ovarian tissues were evaluated for light and electron microscopy. SIRT1 and AMPK immunreactivity were scored. Blood samples obtained from rats analysed for FSH, LH, Testosterone, AMH, TNF- α and MDA levels. Data were statistically analysed with SPSS programme.

Results: Body and ovarian weight were significantly increased in PCOS groups compared to control groups. No significant difference was observed between groups in terms of serum FSH levels. LH, Testosteron, AMH, TNF- α and MDA levels were increased in PCOS groups while treatment groups improved this levels. SIRT1 and AMPK immunreactivity were higher in all treatment groups. PCOS groups exhibited more cystic and atretic follicles than the control and treatment groups. Apoptotic index and ultrastructural examinations supported this data.

Conclusion: In the light of the results of this study, application of metformin and resveratrol has been found to have therapeutic effects on the pathological changes (as morphological, biochemical data and ultrastructural) seen in PCOS ovary. % 5-10 of women in the world suffer from PCOS one of the most important causes of infertility and, according to our study, especially combined use of metformin and resveratrol hold promise in the treatment of patients with PCOS.

Keywords: PCOS, Resveratrol, Metformin, Oxydative stress, Inflammation

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında değerli bilgileriyle bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Süreyya CEYLAN ve Doç. Dr. E. Elif GÜZEL MEYDANLI'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Yüksek lisans eğitimi boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan ve desteklerini her zaman hissettiğim çok değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail SEÇKİN, Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, Prof. Dr. Serdar FİLİZ, Prof. Dr. Süheyla GONCA ve Doç. Dr. Yusufhan YAZIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin biyokimyasal deney ve değerlendirmelerinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Yard. Doç. Dr. F. Ceyla ERALDEMİR ve değerli asistanı Dr. Tuğba KUM'a her türlü yardım ve desteği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde fikir, öneri ve ilgileriyle bana destek olan Emb. Sema KURNAZ ÖZBEK, Dr. Ayşegül AYTEKİN, Bio. Kübra KAVRAM, Mol. Bio. Fazilet DEDE, Mol. Bio. Mehmet SARIHAN, Bio. Sabriye KARADENİZLİ ve Dr. Liridona ADİLİ OSMANİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitim sürecim boyunca her türlü aşamada ve konuda yanımda olan Bio. Zehra SEZER, Bio. Tuğba EKİZ YILMAZ ve Mol. Bio. Başak İŞILDAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, sevgi ve ilgileriyle bana güç veren ve bana inanan sevgili aileme ve eşime çok teşekkür ederim.

Selenay Hümeýra FURAT RENÇBER

KOCAELİ, Haziran 2016

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

07/06/2016

Selenay Hümeyra FURAT RENÇBER

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ETİK KURUL.....	iv
ÖZET	v
TEŞEKKÜR	vii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Ovaryum.....	1
1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi.....	1
1.1.2. Ovaryumun Anatomisi	1
1.1.2.1. Ovaryumun Damar ve Sinirleri	2
1.1.3. Ovaryumun Histofizyolojisi	3
1.1.4. Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Foliküllerin Gelişimi	3
1.1.4.1. Primordiyal Folikül	4
1.1.4.2.Primer Folikül	5
1.1.4.3. Sekonder Folikül	5
1.1.4.4. Tersiyer (Olgun) Folikül (Graaf Folikülü)	6
1.1.4.5.Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşması.....	7
1.2. Polikistik Over Sendromu (PKOS)	8
1.2.1. PKOS ve Hiperandrojenizm.....	10
1.2.2.PKOS ve Antimüllerian Hormon(AMH)	10
1.2.3.PKOS ve Oksidatif Stres.....	11
1.2.4. PKOS ve Kronik İnflamasyon.....	14

1.2.5.PKOS, Oksidatif Stres ve Kronik İnflamasyon.....	15
1.3.Resveratrol	15
1.3.1.Resveratrolün Etki Mekanizması	16
1.3.1.1. Sirtuinlerin Aktivasyonu	16
1.3.1.2.AMPK'nın Aktivasyonu	17
1.3.1.3.NF- κB'nin İnhibisyonu.....	18
1.3.2.Resveratrolün Ovaryum Üzerindeki Etkisi	18
1.3.2.1.Resveratrol ve PKOS	20
1.3.3. Resveratrol ve Antioksidan Mekanizma	21
1.3.4. Resveratrol ve Kardiyoprotektif Etkisi.....	22
1.3.5. Resveratrol ve Nöroprotektif Etkisi	22
1.3.6. Resveratrol ve Antikanser Etkisi.....	22
1.4. Metformin	23
2.AMAÇ.....	25
3. YÖNTEM	28
3.1.Deney Hayvanları.....	28
3.1.1.Vajinal smear	28
3.1.1.1.Vajinal Yayma Metod	29
3.2. Sakrifikasyon.....	30
3.3.Vücut Ağırlıklarının Ölçümü	30
3.4.Ovaryum Ağırlıklarının Ölçümü	30
3.5.Biyokimyasal Analiz	31
3.5.1.Doku Homojenizasyonu.....	31
3.5.1.1.TNF-α ve AMH Tayini	31
3.5.1.2.Dokuda Protein Tayini	31
3.5.2.Kanda FSH, LH, Testosteron, MDA, AMH ve TNF-α Tayini	31
3.5.2.1. FSH, LH ve Testosteron Ölçümü	31

3.5.2.2.AMH ve TNF- α Ölçümü.....	31
3.5.2.3.Malondialdehit Ölçümü.....	31
3.6. Işık Mikroskopi Uygulamaları	32
3.6.1.Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme ve Folikül Sayımı	32
3.6.2.Masson Trikrom Boyaması	32
3.6.3.İmmünohistokimyasal Uygulamalar	33
3.6.3.1.SIRT1 İmmünohistokimyası	33
3.6.3.2. AMPK İmmünohistokimyası	34
3.6.3.3.TUNEL Boyaması.....	34
3.7.Ultrastrüktürel Yöntemler	35
3.8.İstatistiksel Analiz.....	36
3.9. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar	36
3.9.1. Kimyasal Malzemeler	36
3.9.2. Cihazlar	37
4.BULGULAR.....	38
4.1.Vajinal Smear Bulguları.....	38
4.2.Vücut Ağırlığı	39
4.3.Ovaryum Ağırlığı	39
4.4.Biyokimya Bulguları.....	40
4.4.1. FSH, LH, LH/FSH ve Testosteron Seviyeleri.....	40
4.4.2. Plazma ve Doku AMH Tayini.....	42
4.4.3. Plazma ve Doku TNF- α Tayini	44
4.4.4. Serum MDA Seviyeleri ile Lipit Peroksidasyonun Tayini.....	45
4.5. Işık Mikroskopi Bulguları	45
4.5.1. H&E Boyaması ve Folikül Sayımı Bulguları.....	45
4.5.2. Masson Trikrom Boyama Bulguları.....	52
4.5.3. İmmünohistokimya Bulguları	57

4.5.3.1. SIRT1 İşaretlemesi.....	57
4.5.3.2. AMPK İşaretlemesi.....	59
4.5.3.3. TUNEL İşaretlemesi ile Apoptotik Hücre Tayini	62
4.6. TEM ile Ultrastrüktürel İnceleme	66
5. TARTIŞMA.....	76
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	97



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a.: Arteria

AEC: Aminoetil Karbazol

AMH: Antimüllerian hormon

AMP: Adenozin Monofosfat

AMPK: Adenozin monofosfat-aktifleyici protein kinaz

AP-1: Aktif protein- Nüklear faktör-κB

APSAA: Akut faz serum amiloid A

ATP: AdenozinTrifosfat

cAMP: SiklikAdenozin Monofosfat

CAT: Katalaz

CCl4: Karbon tetraklorit

ATP: Adenozin trifosfat

CRP: C-reaktif protein

D: Diöstrus

D1: Diöstrus 1

D2: Diöstrus 2

DAB: Diaminobenzidin

DHEA: Dehidroepiandrosterone

Dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik Asit

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER: Endoplazmik Retikulum

F: Folikül

FOXO1: Forkhead box protein O1

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GLUT-4: Glucose transporter type 4

GPX - GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

H&E: Hematoksilen ve Eozin Boyası

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HIF-1: Hipoksi ile indüklenen faktör

HIF-2: Hipoksiyle uyarılabilir faktör-2

IL: İnterlökin

IU: International Unit
İp: İntraperitoneal
Lig.: Ligamentum
LH: Lüteinizan Hormon
LPO: Lipit Peroksid
M: Metöstrus
MDA: Malondialdehit
MIS: Müllerian inhibitör faktör
MCP-1: Monosit kemotaktik protein-1
MT: Masson Trikrom Boyası
n.: Nervus
NAD+: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
NF-κB: Nükleer faktör-κB
Nm: Nanometre
O₂: Oksijen
OHSS: Ovaryan hiperstimulasyon sendromu
OsO₄: Osmiyum Tetraoksit
OS: Oksidatif stres
Ö: Östrus
P: Proöstrus
p50: Nükleer faktör kappa B'nin 50 kDa alt birimi
p53: Tümör protein 53
p65: Nükleer faktör kappa B'nin 65 kDa alt birimi
PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu
PGC-1: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PGC-1a: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PKOS: Polikistik Over Sendromu
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm: Dakikada dönüm sayısı
Sn: Saniye
SHBG: Seks hormon bağlayıcı globulin
SIRT1: Sessiz bilgi düzenleyici 1, Sirtuin
SIRT3: Sessiz bilgi düzenleyici 3

SiRNA: Küçük interferans RNA

SOD: Süperoksit Dismutaz

TBA: Tiyobarbitürik asit

TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

T-PBS: Tween'li Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik

TUNEL: TdT-dUTP nick-end- labelling

UV: Ultraviyole

v.: Vena

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

μm : Mikrometre

μ : Mikron

$^{\circ}\text{C}$: Selsius

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Ovaryumun genel görüntüsü ve folikülogenez.....	3
Çizim1.2. Primordiyal folikül	4
Çizim1.3. Primer folikül.....	5
Çizim1.4.Sekonder folikül	6
Çizim 1.5.Tersiyer folikül	7
Çizim 1.6. Polikistik over ultrason görüntüsü.....	9
Çizim 1.7.Normal ve polikistik ovaryumun şematik görüntüsü.....	9
Çizim 1.8.AMH'in ovaryum üzerindeki etkisini gösteren şematik model.....	11
Çizim 1.9.Oksidatif stres ve infertilite arasındaki ilişki.....	14
Çizim 1.10.Resveratrolün kimyasal yapısı.....	15
Çizim 1.11.SIRT1 ve AMPK arasındaki ilişki.....	18
Çizim 1.12.PKOS tedavisinde resveratrolün kullanımı	20
Çizim 1.13.Metforminin kimyasal yapısı.....	23
Çizim 3.1.Deney gruplarının şematik görüntüsü.....	30
Çizim 4.1.Kontrol ve PKOS gruplarına ait vajinal smear örnekleri.....	38
Çizim 4.2.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında vücut ağırlıklarının karşılaştırılması	39
Çizim 4.3. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması.	40
Çizim 4.4. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum FSH seviyelerinin karşılaştırılması	41
Çizim 4.5.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum LH seviyelerinin karşılaştırılması	41
Çizim 4.6.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum LH/FSH seviyelerinin karşılaştırılması	42
Çizim 4.7.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum testosteron seviyelerinin karşılaştırılması. 42	
Çizim 4.8.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında plazma AMH seviyelerinin karşılaştırılması.....	43
Çizim 4.9.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında doku AMH seviyelerinin karşılaştırılması	43
Çizim 4.10.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında plazma TNF- α seviyelerinin karşılaştırılması ...	44
Çizim 4.11.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında doku TNF- α seviyelerinin karşılaştırılması.....	44
Çizim 4.12.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum MDA seviyelerinin karşılaştırılması.	45

Çizim 4.13.Kontrol grubuna ait H&E mikrografları	47
Çizim 4.14.PKOS+Etanol grubuna ait H&E mikrografları	47
Çizim 4.15.PKOS grubuna ait H&E mikrografları	48
Çizim 4.16.PKOS+Salin grubuna ait H&E mikrografları.....	49
Çizim 4.17.PKOS+Resveratrol grubuna ait H&E mikrografları.	49
Çizim 4.18.PKOS+Metformin grubuna ait H&E mikrografları.....	50
Çizim 4.19.PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait H&E mikrografları.....	51
Çizim 4.20. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarındaki primordiyal, p.unilaminar, p.multilaminar, sekonder, tersiyer, korpus luteum ve atretik foliküllerin sayıları.....	52
Çizim 4.21. Kontrol grubuna ait MT mikrografi.....	53
Çizim 4.22.PKOS grubuna ait MT mikrografları.....	54
Çizim 4.23.PKOS+Etanol ve PKOS+Salin gruplarına ait MT mikrografları	55
Çizim 4.24.PKOS+Resveratrol grubuna ait MT mikrografları.....	55
Çizim 4.25. PKOS+Metformin grubuna ait MT mikrografları	56
Çizim 4.26. PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait MT mikrografları	56
Çizim 4.27.Kontrol,PKOS,PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin, PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait SIRT1 işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.	58
Çizim 4.28. Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS + Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerin SIRT1 immünreaktivitesine ait H-skor ortalama değerleri..	59
Çizim 4.29a.Kontrol grubuna ait AMPK işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	60
Çizim 4.29b. PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait AMPK işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.	61
Çizim 4.30.Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerin AMPK immünreaktivitesine ait H-Skor ortalama değerleri.	61
Çizim 4.31.Kontrol gruplarına ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	62
Çizim 4.32. PKOS, PKOS+Salin, PKOS+Etanol gruplarına ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.	63
Çizim 4.33. PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin, PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.....	64

Çizim 4.34.a. Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin, PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerdeki granüloza hücrelerinin TUNEL işaretleme ile elde edilen apoptotik indekslerin ortalama değerleri	65
Çizim 4.34.b. Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin, PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerdeki teka hücrelerinin TUNEL işaretleme ile elde edilen apoptotik indekslerin ortalama değerleri	65
Çizim 4.35. Kontrol grubuna ait elektron mikrograflar	67
Çizim 4.36a.PKOS grubu granüloza hücrelerine ait elektron mikrograflar	69
Çizim 4.36b.PKOS grubu teka hücrelerine ait elektron mikrograflar	70
Çizim 4.36c.PKOS grubu oosite ait elektron mikrograflar	70
Çizim 4.37. PKOS+Salin grubuna ait elektron mikrograflar	71
Çizim 4.38. PKOS+Etanol grubuna ait elektron mikrograflar	72
Çizim 4.39. PKOS+Resveratrol grubuna ait elektron mikrograflar	73
Çizim 4.40. PKOS+Metformin grubuna ait elektron mikrograflar	74
Çizim 4.41. PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait elektron mikrograflar	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.PCOS hastalarında görülen oksidatif stres belirteçleri.....	13
---	----



Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIğI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIğI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nn imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- n sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

..7.. / 0.6 / 2016

Danışman

İmza



1.GİRİŞ

1.1. Ovaryum

1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Embriyonik yaşamın ilk ayında, primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesinden gonad taslağına göç eder. Gonadlara ulaştıklarında bu hücreler dişi organizamada oogonyumlara dönüşür (Massimo 2010). Bu esnada sölom epitelinin proliferasyonu ile primer cinsiyet kordonları gelişir. Yedinci haftada ise ovaryum yüzey epitelinin proliferasyonu ile sekonder cinsiyet kordonları oluşur. Oogonyumlar art arda yoğun bölünmeler geçirerek intrauterin yaşamın ikinci ayında yaklaşık 600.000'e, beşinci ayında ise 7 milyonun üzerinde bir sayıya ulaşır. Üçüncü aydan başlayarak oogonyumlar 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girer ve profazın diploten evresinde kalarak primer oositlere dönüşür. (Aytekin ve Solakoğlu 2009, Ovalle 2013). Doğuma kadar mevcut oositlerin \approx %80'i atreziye uğrar ve yeni doğan bebekte yaklaşık 600.000-800.000 folikül bulunur (Sadler 2010, Moore ve Persaud 2009). Bu sayı adolesan dönemde 40.000'in altına iner ve foliküller atreziye birlikte 40-45 yaşlarında geriye yaklaşık 8.000 oosit kalır (Anthony 2013, Moore ve Persaud 2009).

1.1.2. Ovaryumun Anatomisi

Ovaryumlar yetişkinlerde 3 cm uzunluğunda, 1,5-2 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve 3-5 gr ağırlığında olan badem şeklinde bir çift organdır. Pelvik boşluğun yan duvarlarının arkasında bulunan fossa ovarica'larda yer alırlar. Fossa ovarica adı verilen bu çukur, a. iliaca externa ile a. iliaca interna arasında yer alır. Bu çukur aşağı ve ön taraftan lig. latum uterinum tabanı, yukarıdan a. iliaca externa ve arkadan ise ureter ile sınırlanır. Çukurun dibinde peritoneumun altından a. obturatoria, v. obturatoria ve n. obturatorius geçer. (Ovalle ve Nahirney 2013, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000).

Ovaryumların yüzeyi tunika albuginea adı verilen bağ dokusu ile örtülü olması nedeniyle pembe-beyazımsı renktedir. Puberteye kadar düz ve pürüzsüz olan ovaryum yüzeyi ovulasyon sürecinin başlamasından sonra pürüzlü bir hale gelir (Ovalle ve Nahirney 2013, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000).

Her bir ovaryumun; facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, önde margo mesovaricus arkada margo liber olmak üzere iki kenarı, lateralde ekstremite tubaria medialde ekstremite uterina olmak üzere de iki ucu yer alır. Ön kenar olan margo mesovaricus düz olup kısa bir peritoneal pлика olan mesovarium lig. latum uteriye bağlanır.

Medial uç olan ekstremitas uterina ile cornu uteri arasında lig. ovarii proprium (lig. uteroovaricum, chorda uteroovarica) uzanır. İliak damarların ön tarafında yukarı doğru uzanan bir periton plikası olan lig. suspensorium ovarii (infundibulopelvik bağ) ile ovaryum pelvik duvara bağlanır (Ovalle ve Nahirney 2013, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000, Waugh ve Grant 2001, Standring 2005, Gökmen 2003).

1.1.2.1. Ovaryumun Damar ve Sinirleri

Ovaryum arterleri: Ovaryumların kanlanmaları asıcı bağ (lig. suspensorium ovarii) içindeki damarlarla sağlanır. Ovaryumlara kan getiren esas damar arteria ovarica olup abdominal aortanın kollarındandır. L2 (ikinci bel omuru) seviyesinde, a. renalis altında aortadan ayrılır. A. ovarica asıcı bağ içinde ilerleyerek mesovaryuma gelir. Ovaryumların kanlanmasını sağlayan ikincil damar ise uterin arterin ovaryan dalıdır (ramus ovaricus). Mezovaryumda, ovaryumlara kan getiren ramus ovaricus ile a. ovarica anastomoz yaparlar. Bu iki büyük arter, halka şeklinde kıvrıldığından ve dallandığından helisin arter olarak isimlendirilir. Arterler ovaryuma hilustan girerek medulla ve korteks sınırında pleksus meydana getirir. Bu pleksustan dağılan dallar foliküllerin etrafını saran kılcal damar ağını oluştururlar (Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000, Gökmen 2003, Waugh ve Grant 2001, Standring 2005).

Ovaryum venleri: Ovaryum venleri a. ovarica'ları takip ederek birlikte yükselir ve pleksus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluştururlar. Karın boşluğunda v. ovarica dekstra (sağ ovaryan ven) inferior vena kavaya, v. ovarica sinistra (sol ovaryan ven) sol renal vene (v. renalis sinistra) açılır (Snell 1995, Waugh ve Grant 2001, Standring 2005, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000).

Ovaryum lenfleri: Ovaryumların lenf damarları a. ovarica'yı takip ederler ve L2 (ikinci bel omuru) seviyesinde nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar (Gökmen 2003, Snell 1995, Standring 2005, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000).

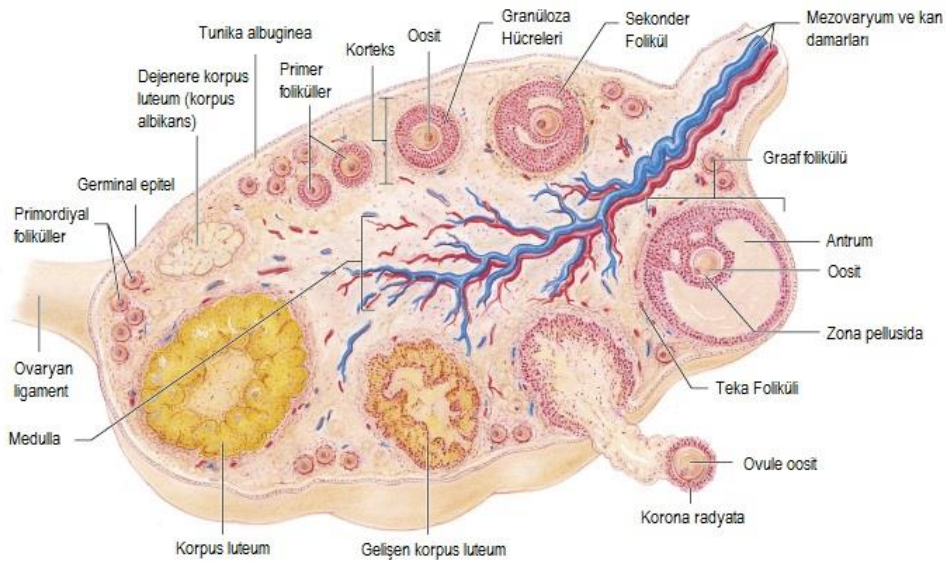
Ovaryum innervasyonu: Ovaryuma ait sinirler pleksus hypogastricus inferior (ya da pleksus pelvicus) ve a. ovarica'nın etrafında yer alan pleksus ovaricus aracılığı ile gelir. Otonom sisteme ait sempatik lifler (n. splanchnicus minor) aracılığı ile, parasempatik lifleri ise n. vagus aracılığı ile gelir (Gökmen 2003, Snell 1995, Arıncı ve Elhan 2001, Yıldırım 2000).

1.1.3. Ovaryumun Histofizyolojisi

Ovaryum, dişide gamet üretilmesi ve steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanması fonksiyonlarının gerçekleştiği yerdir. Ovaryumda başlıca iki hormon salgılanır; bunlar östrojen ve progesterondur. Östrojen iç ve dış genital organların büyümesinden ve pubertede dişi seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Östrojen sentezi öncelikle LH (Luteinizan Hormon) tarafından uyarılmış teka interna hücrelerinin androjen sentezlemesiyle başlamaktadır. Daha sonra granüloza hücreleri FSH (Folikül Stimülan Hormon)'ın etkisiyle üretilen androjenleri östrojene dönüştürmektedir. Östrojenler granüloza hücrelerini, proliferere olup folikülün boyutunu arttırmak üzere stimüle eder. Progesteron ise başta uterus olmak üzere iç genital organları gebeliğe, lobüler proliferasyonu uyararak da meme bezini laktasyona hazırlar (Ross 2011).

1.1.4. Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Foliküllerin Gelişimi

Ovaryum yetişkinlerde 3 cm uzunluğunda ve 1,5-2 cm genişliğinde olan badem şeklinde bir organdır (Ovalle ve Nahirney 2013). Yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı prizmatik veya kübik epitel ile döşelidir. Germinal epitelin altında tunika albuginea adı verilen yoğun düzensiz bir sıkı (tıkız) bağ dokusu bulunur (Ross 2011). Tunika albuginea'nın altında bulunan korteks bölgesinde ovaryum folikülleri yer alır; medulla bölgesi ise gevşek bağ dokusu içerisinde zengin bir damar yatağı ve sınırları taşır (Çizim 1.1). Puberteden önce düzgün olan ovaryum yüzeyi, üreme döneminde tekrarlanan ovulasyonlar nedeniyle düzensiz ve skarlı olur (Demir 2006).



Çizim 1.1. Ovaryumun genel görüntüsü ve folikülogenez

(http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/CH27_Ovarian_Follicles.htm)

Histolojik olarak ovaryumda 3 temel folikül tipi tanımlanmıştır:

1- Primordiyal Folikül

2- Olgunlaşan Folikül

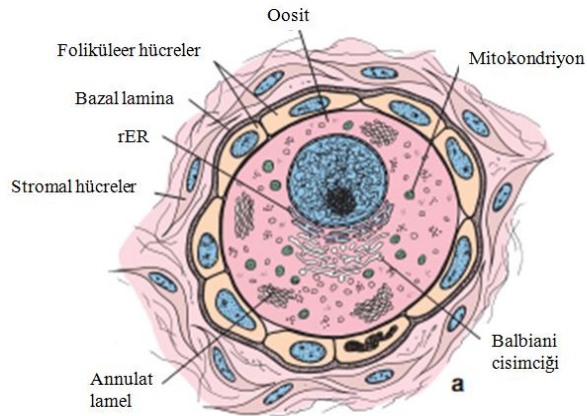
a- Primer Folikül (primer unilaminar [p. unilaminar] ve primer multilaminar [p. multilaminar] folikül)

b- Sekonder Folikül

3- Graaf Folikülü (Olgun Folikül)

1.1.4.1. Primordiyal Folikül

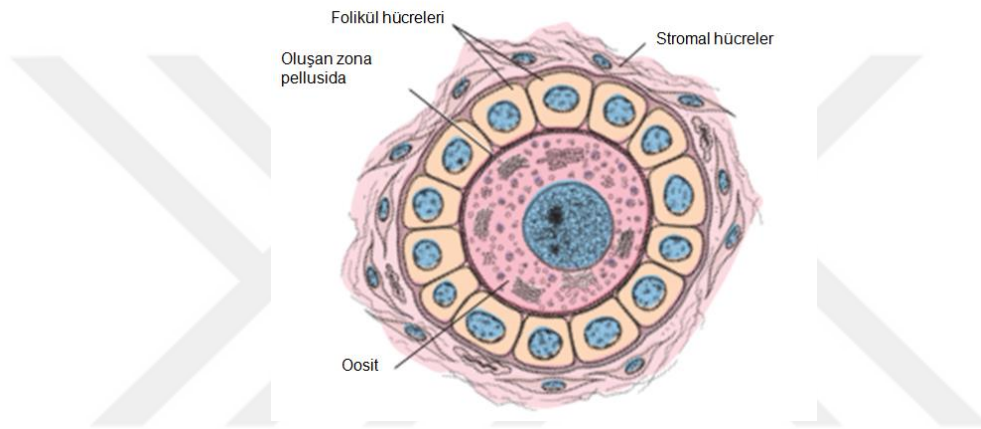
Primordiyal foliküller, tunika albugineanın hemen altında gruplar halinde bulunur ve primer oosit ile oositi saran tek katlı yassı folikül hücrelerinden meydana gelmektedir (Çizim 1.2) (Sadler 2010). Primordiyal foliküldeki oosit yaklaşık 30 µm çapında küre şeklinde bir hücredir. Hafifçe eksantrik yerleşmiş büyük bir nükleusu ve iri bir nükleolusu bulunur. Sitoplazmasında golgi kompleksi, endoplazmik retikulum (ER), mitokondriyon ve lizozom gibi organellerin nükleusa yakın konumda lokal bir küme oluşturmasıyla Balbiani cismi oluşur. Birbirlerine desmozomlarla bağlanmış yassı folikül hücreleri ise ER, mitokondriyon ve lipid damlaları içerir. Folikül hücrelerini saran bazal lamina folikülleri stromadan ayıran sınırı oluşturur (Ross 2011, Aytakin ve Solakoğlu 2009).



Çizim1.2. Primordiyal folikül (Ross 2011)

1.1.4.2. Primer Folikül

Primordiyal foliküllerin gelişmesiyle oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişimler meydana gelir. İlk olarak oosit büyür ve onu çevreleyen folikül hücrelerinin sayısı artar ve tek tabakalı kübik hale gelir. Bu foliküle unilaminar primer folikül denir. Bu aşamada primer oosit kendini bir kılıf gibi saran zona pelusida yapısını sentezlemeye başlar. Folikül hücrelerinin proliferasyonu ile oositin çevresi çok tabakalı folikül hücreleri ile çevrelediğinde multilaminar primer folikül oluşur. Bu aşamadan sonra folikül hücreleri granüloza hücreleri olarak isimlendirilir. Stroma hücreleri multilaminar primer folikül çevresinde organize olarak teka folikülü tabakasını oluşturur (Ross 2011, Gartner ve Hiatt 2007).

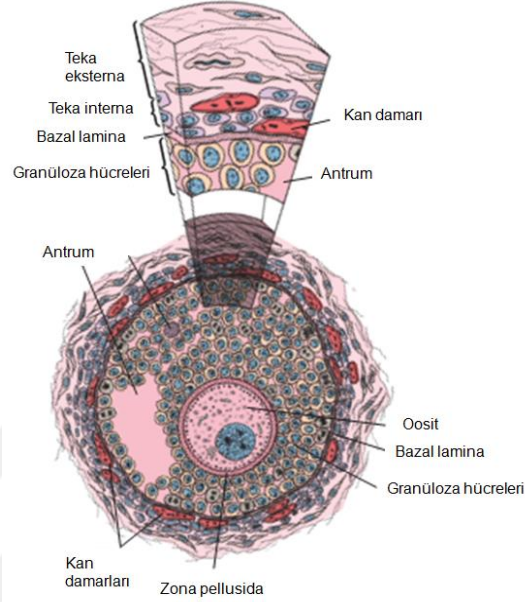


Çizim1.3. Primer folikül (Ross 2011)

1.1.4.3. Sekonder Folikül

P. multilaminar folikül büyümeye devam ederken folikül çapı 200 μm 'nin üzerine çıkar ve granüloza hücreleri arasında folikül sıvısı içeren küçük boşluklar oluşmaya başlar. Bu haliyle folikül sekonder folikül adını alır. Folikül sıvısı, plazma bileşenlerini ve granüloza hücreleri tarafından salgılanan ürünleri içerir. Bu ürünler; glikozaminoglikanlar ve steroid hormon bağlayıcı proteinler ile progesteron, östradiol, inhibin, aktivin, follistatin gibi hormonlardır. Üretilen sıvı miktarı arttıkça içi sıvı dolu boşluklar birleşerek antrum denen tek bir boşluğu oluşturur. Granüloza hücrelerinin proliferasyonu bu aşamada FSH'a bağımlı hale gelir. Sekonder folikül evresinde teka tabakası içte steroid salgısı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta fibroblast benzeri hücreler içeren teka eksterna tabakalarına ayrılır. Teka interna tabakasının damarlanması oldukça iyidir; hücreleri steroid üreten hücrelerin karakteristik özelliklerini gösterir ve çok sayıda LH reseptörü içerir. LH uyarısı ile teka interna hücreleri tarafından sentezlenen östrojen öncülü

androstenedion granüloza hücrelerine aktarılır ve burada aromataz enzimiyle östrojene dönüştürülür. Teka interna sekretuar hücelere ek olarak fibroblast ve kollajen lifleri de içerir. Teka internanın dış kısmında bulunan teka eksternada fibroblast benzeri hüceler, düz kas hüceleri ve kollajen lif demetleri bulunur (Ross 2011, Aytekin ve Solakoğlu 2009, Sadler 2010).



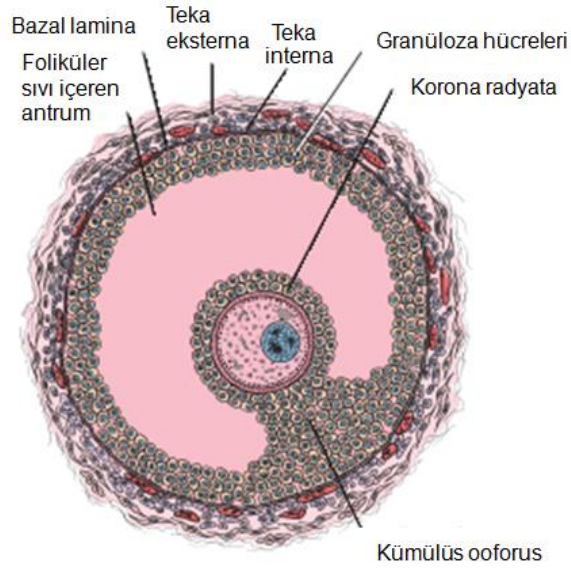
Çizim1.4.Sekonder folikül (Ross 2011)

1.1.4.4. Tersiyer (Olgun) Folikül (Graaf Folikülü)

Her menstrüal siklus dönemi sırasında genellikle bir folikül diğerlerinden daha fazla büyüyerek baskın hale gelirken diğerleri yıkıma uğrar. Normal şartlarda baskın olan folikül, foliküler büyümenin en son aşamasına ulaşarak ovulasyonu gerçekleştirir. Olgun folikül ya da Graaf folikülü olarak adlandırılan bu folikül ovulasyon öncesinde yaklaşık 2-2,5 cm çapındadır. Folikül sıvısının artması ile antrum giderek genişler. Oosit, kümülüs ooforus adı verilen granüloza hücelereinden oluşan bir sap ile folikül duvarına bağlanır. Ovulasyon esnasında oosit ve oositi çevreleyen korona radiata, kümülüs ooforustan ayrılır ve oosit-zonapellusida-korona radiata kompleksi folikül sıvısı içinde serbest olarak yüzer.

Primer ve sekonder folikülde bulunan granüloza hüceleri sadece FSH reseptörleri içerirken Graaf foliküllerinde bulunan granüloza hücelereinde ovulasyon öncesinde LH reseptörleri gelişir. Bu olay ovulasyon sonrası folikülün lüteinizasyonu veya korpus

luteumun gelişmesi açısından önemlidir (Ross 2011, Gartner ve Hiatt 2007, Anthony 2013).



Çizim 1.5.Tersiyer folikül (Ross 2011)

1.1.4.5.Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşması

Ovulasyon, sekonder oositin Graaf folikülünden salınmasıdır. Ovulasyondan sonra folikülde kalan granüloza ve teka hücrelerinden oluşan duvar, derin katlantılar yapar ve teka internadaki kapillerler folikül lümenine akar; böylece korpus hemorajikum meydana gelir. Teka internadan sağlanan kan ve lenf damarları zengin vasküler bir ağ oluşmasını sağlar. Stromadaki bağ doku foliküler boşluğa göç eder. Granüloza ve teka interna tabakasındaki hücrelerin büyüklükleri ve sitoplazmalarında bulunan lipit damlacıklarının miktarı artar; hücreler granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine dönüşür. Bu durum luteinizasyon olarak adlandırılır ve oluşan bu yapıya korpus luteum (sarı cisim) ya da luteal beze adı verilir. Lipit damlacıklarında bulunan lipokrom pigmenti lutein hücrelerine sarı rengini vermektir. Bu hücreler steroid yapıda salgı sentezledikleri için bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulum ve tübüler kristal mitokondriyon içerir. Granüloza lutein hücreleri merkezi yerleşimli, daha büyük yapıda hücreler iken teka lutein hücreleri ise daha küçük, yoğun boyanan ve periferik yerleşimli hücrelerdir.

Korpus luteum, progesteron ve östrojen salgılar; bu sayede endometriyumun gelişmesini ve sekretuar aktivitesini stimule ederken endometriyumu zigotun implantasyonu için hazırlar (Ross 2011).

1.2. Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu üreme çağındaki kadınlarda görülen en yaygın endokrin bozukluklardan biridir ve anovulatuvar infertilitenin esas nedenidir (Joham ve diğ 2015).

İlk kez 1884 yılında, Chereau tarafından ‘ovaryum morfolojisinde değışim’ olarak tanımlanmış (Chereau 1844); 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael Leventhal tarafından kadınlarda anovulasyon ile ilişkili bir sendrom olarak kabul edilmiştir. Hastalık yerine ‘sendrom’ ifadesinin kullanılması, semptomlar ve bulgular topluluğunun varlığı ve tek bir tanı testi olmaması nedeniyle genel kabul görmüştür (Stein ve Leventhal 1935). 2003 yılında ise The European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ve The American Society for Reproductive Medicine (ASRM) tarafından PKOS için ‘Rotterdam Consensus Kriterleri’ olarak da bilinen teşhis kriterleri oluşturulmuştur (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PKOS Consensus Workshop Group, 2004). Bu kriterlere göre PKOS teşhisi için; oligo-ovulasyon, biyokimyasal hiperandrojenizm ve ultrason bulgularıyla değerlendirilen polikistik ovaryum morfolojisi kriterlerinden en az ikisi bulunmalıdır.

Oligo-ovulasyon ve kronik anovulasyon PKOS’ta yaygındır; bunun sonucunda meydana gelen menstrüel düzensizlik PKOS semptomlarından biri olarak nitelendirilir (Ehrmann 2005).

PKOS’ta görülen biyokimyasal hiperandrojenizm testosteron, androstenedion, dehidroandrostenedion, dehidroandrostenedion sülfat ve 17-hidroksiprogesteron gibi androjenik hormonların artan serum konsantrasyonları ile karakterizedir (Sabuncu ve diğ 2003). Ayrıca bozulan gonadotropin salınımıyla ilişkili olarak FSH ile kıyaslandığında artan LH sekresyonu gözlemlenmektedir (Ehrmann 2005).

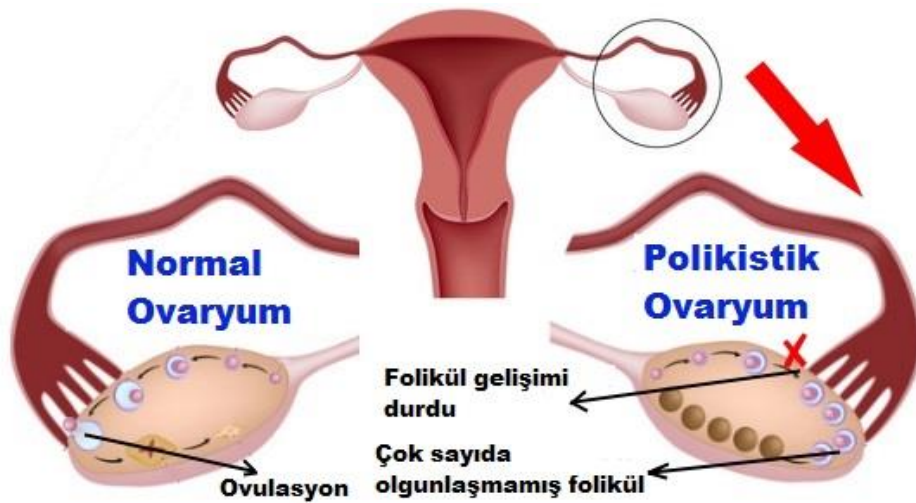
Klasik olarak PKOS’da infertilitenin primer sebebi anovulasyondur. Anovulasyona neden olan LH hipersekresyonu ile infertilite arasındaki ilişki sanıldığından daha komplekstir. LH ayrıca bilinmeyen bir mekanizma ile fertilizasyon ve erken gebelik kayıpları ile de ilişkili olabilir (Balen ve diğ. 1993, Curry ve diğ. 1989). Ovulasyon indüksiyonundaki ve yardımcı üreme tekniklerindeki son gelişmelere rağmen PKOS’lu infertil hastalar hakkındaki gerçekler çok fazla değişmemistir.

PKOS’a ait histolojik bulgular ultrasonografide en az 8 küçük folikülün (610 mm çapında) periferik halka oluşturması şeklinde gözlemlenir (Ehrmann 2005, Atiomo ve diğ. 2003).



Çizim 1.6. Polikistik over ultrason görüntüsü (<https://www.permanence.com.au>)

PKOS morfolojisine bakıldığında ovaryuma ait kortikal kalınlaşma, çok sayıda kistik folikül, luteinize teka interna, stromal hiperplazi ve folikülogenezin durduğunu gösteren çok sayıda olgunlaşmamış folikül görülür (Clément ve diğ. 2002). Ayrıca PKOS sonucunda; küçük foliküllerin artan sayısı, terminal foliküler büyümenin inhibisyonu, dominant folikülün seçiminde yoksunluk (foliküler duraksama) ve foliküler apoptoz defekti gibi folikülogenezle ilgili birçok anormallik de görülmektedir.



Çizim 1.7. Normal ve polikistik ovaryumun şematik görüntüsü (HealthyAndNaturalWorld.com)

PKOS basit lokal bir rahatsızlıktan çok kronik, sistemik bir hastalık olarak nitelendirilmiştir. Patojenez mekanizması iyi tanımlanamamasına rağmen sıklıkla hiperandrojenizm, kronik inflamasyon, oksidatif stres ve insulin direnciyle ilişkili bulunmuştur (Murri ve diğ. 2013, Zhang ve diğ. 2012, Lim ve diğ. 2012; DeGroot ve diğ. 2011, Moran ve diğ. 2010). Ayrıca viseral obezite, artan vücut yağlanması, Tip II Diyabetes mellitus, kardiyovasküler bozukluklar (Hunter ve Sterrett 2000), hipertansiyon, gebelik-indüklü hipertansiyon, preeklampsi, gestasyonel diabetes mellitus, düşük yapma sıklığı ve erken doğum da PKOS'la ilişkili bulunmuştur (Boomsma ve diğ. 2006, Roos ve diğ. 2011).

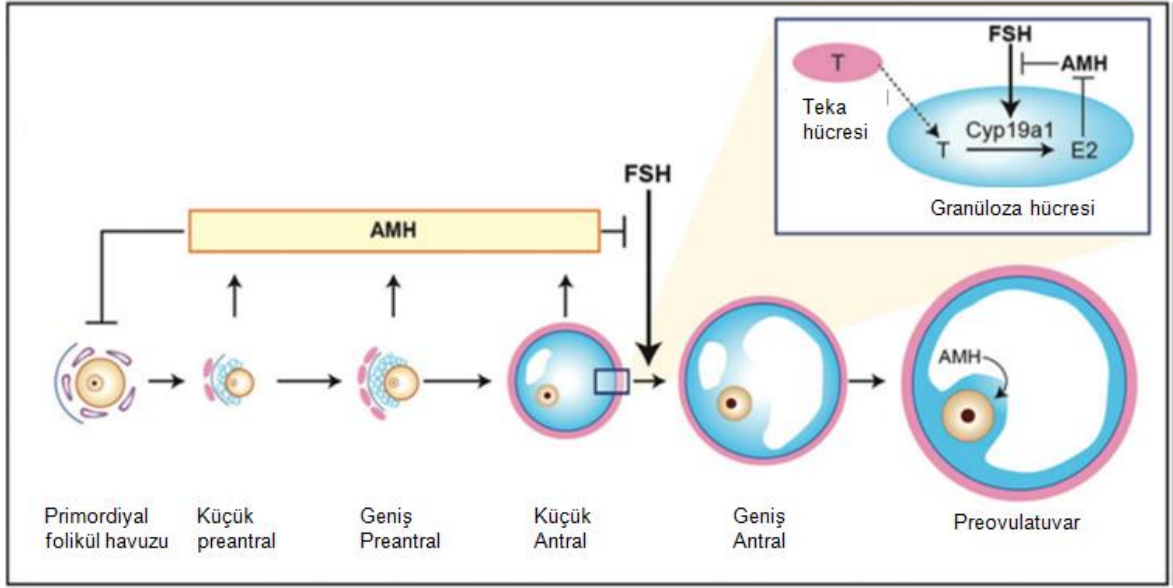
1.2.1. PKOS ve Hiperandrojenizm

Hiperandrojenizm polikistik over sendromunun ana özelliklerinden biridir. Hiperandrojenizm gösteren kadınların %70-80'ine PKOS teşhisi konmuştur (Nisenblat ve Norman 2009).

PKOS'ta hiperandrojenizm ve inflamasyon arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır. Doku inflamasyon belirteci olan TNF- α 'nın sıçanlarda androjen sentezini indüklediği gösterilmiştir (Spaczynski 1999). Diyet-indüklü inflamasyonun PKOS'ta direkt hiperandrojenizmi indüklediği rapor edilmiştir (González ve diğ. 2012). Ayrıca TNF- α , IL-6 ve Tip-II TNF reseptörünü kodlayan çeşitli pro-inflamatuvar belirteçler PKOS'la ilişkili bulunmuştur (Escobar-Morreale ve diğ. 2003, Peral ve diğ. 2002, Villuendas ve diğ. 2002).

1.2.2. PKOS ve Antimüllerian Hormon (AMH)

Müllerian inhibitör faktör (MIS) olarak da adlandırılan Antimüllerian hormon (AMH) TGF- β ailesinin bir üyesidir. Ovaryumda granüloza hücreleri tarafından üretilir ve dominant folikül seçiminde önemli bir role sahiptir (Parahuleva ve diğ. 2012). AMH ekspresyonu primer folikülden başlayıp küçük antral foliküle (4 mm çapında) doğru artarak devam eder; burada en yüksek seviyeye ulaşır ve büyük antral foliküle (44 mm çapında) doğru yavaşça kaybolur (Weenen ve diğ. 2004). AMH ekspresyonu dominant folikül seçilmesiyle azalır ve folikülogenezin FSH-bağımlı aşamalarında artık eksprese edilmez (preovulatuvar foliküllerin kümülüs hücreleri hariç) (Salmon ve diğ. 2004, Durlinger ve diğ. 2002). AMH, menstrüel siklustan bağımsız olarak en iyi ovaryum rezerv belirteci olarak kabul edilmektedir (Maheshwari ve diğ. 2009, Feyereisen ve diğ. 2006 Broekmans ve diğ. 2006).



Çizim 1.8.AMH'nin ovaryum üzerindeki etkisini gösteren şematik model (Dumont ve diğ. 2015)

PKOS'da bozulan folikülogenez sonucunda AMH'nin başlıca üretildiği preantral ve küçük antral foliküllerin sayısında artış görülür (Weenen ve diğ. 2004, Bhide ve diğ. 2014). Bu sebeple PKOS'lu hastalarda AMH seviyesi normale kıyasla 2-4 kat daha fazladır (Lie ve diğ. 2011, Pellatt ve diğ. 2007, Azziz ve diğ. 2009) ve tüm popülasyonlarda bu şekilde görülmektedir (Laven ve diğ. 2004, Pigny ve diğ. 2003). AMH ile antral folikül sayısı arasında korelasyon olduğundan dolayı bu hormon PKOS belirteci olarak kabul edilmektedir (De Vet ve diğ. 2002, Broekmans ve diğ. 2008, Eilertsen 2012). İliodromiti ve ark. (2013) serum AMH seviyesi 4,7 ng/mL'den fazla olan kişilere %79,4 spesifite ve %82,8 duyarlılıkla PKOS teşhisi konulabileceğini ortaya koymuştur (İliodromiti ve diğ. 2013).

Serum AMH ve androjen seviyeleri arasında pozitif korelasyon vardır ve androjenlerin fazla üretilmesi PKOS'ta teka hücrelerinin intrinsik defekti olarak rapor edilmiştir (Laven ve diğ. 2004, Pigny ve diğ. 2003, Gilling-Smith ve diğ. 1994, Carlsen ve diğ. 2009, Eldar-Geva ve diğ. 1999). Ayrıca PKOS'ta granüloza hücrelerinin LH reseptörüne sahip olması normalden daha hızlı olur (Willis ve diğ. 1998).

1.2.3.PKOS ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengenin bozulması sonucunda meydana gelir (Pisoschi ve diğ. 2015). Vücutta serbest radikallerin oluşumu UV ışınları, sigara, alkol gibi çevresel faktörlerin yanı sıra doğal metabolik yollarla da meydana gelmektedir.

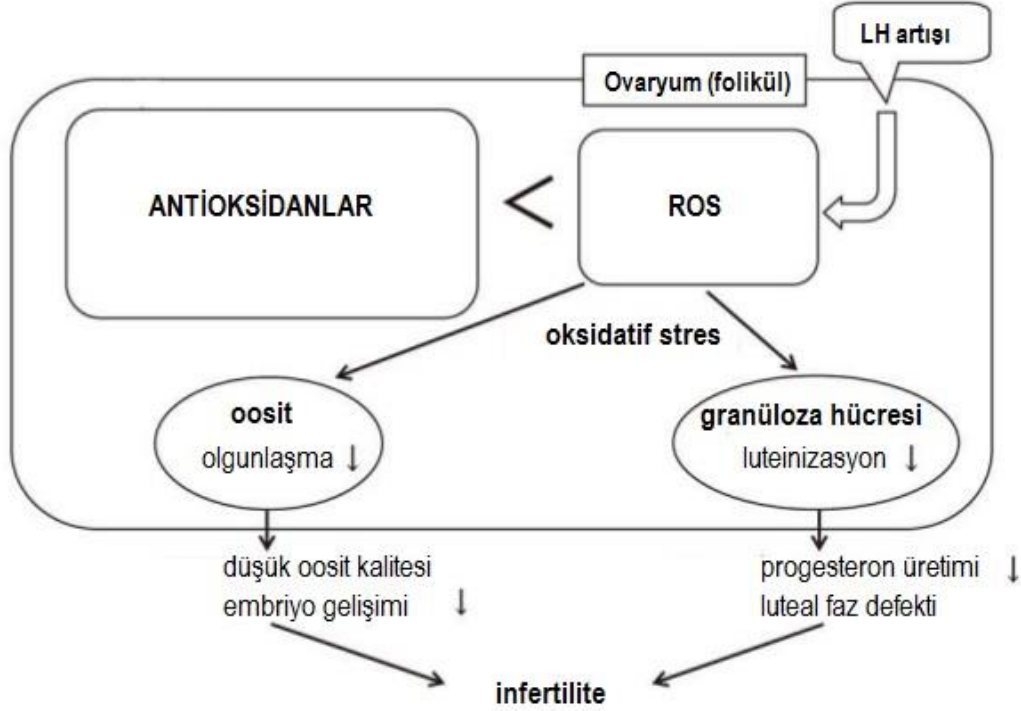
ROS'u açığa çıkaran başlıca doğal mekanizma mitokondriyal elektron transportudur. Mitokondriyon iç membranı oksidatif fosforilasyonun gerçekleştiği alan olması sebebiyle ROS'un en fazla üretildiği yerdir. Bu yüzden mitokondriyonda gerçekleşen oksidatif hasar, hücresel düzeye göre 16 kat daha fazladır (Jenkins ve Goldfarb 1993, Luft 1994, Wallace 1997). Aşırı ROS birikimi hücre (De Bont 2004, Hiraku 2009), protein (Dalle-Donne 2003, Dalle-Donne 2006) ve lipid (Tezil 2014) hasarını indükler. ROS'un hücresel lipitler üzerindeki etkisi, lipit peroksidasyonu ile gerçekleşir. Lipit peroksidasyon ürünleri; oksidatif stresin dokularda, serumda ve idrarda ölçülebilen belirteçleridir (Fang ve diğ. 2002, Halliwell 2007). Lipit peroksidasyonu, yağ asitlerinin oksidasyonu ile başlar. Hidroperoksitlerin oluşumuyla lipit peroksidasyonunun erken aşaması gerçekleşirken, yıkımı ile malondialdehit (MDA) gibi biyoaktif aldehitler meydana gelir. Murri ve ark. (2013) oksidatif stres belirteci olan MDA'nın PKOS'lu hastalarda normale göre belirgin artış gösterdiğini rapor etmiştir (Murri ve diğ. 2013).

Oksidatif stres seviyesi obezite, insulin direnci, hiperandrojenizm ve kronik inflamasyonla anlamlı korelasyon göstermiştir (Nasiri ve diğ. 2015, Savic-Radojevic ve diğ. 2015, Gonz'alez ve diğ. 2012, Federico ve diğ. 2007).

Çizelge 1.1. PCOS hastalarında görülen oksidatif stres belirteçleri (Zuo ve diğ. 2016)

Oksidatif stres belirteçleri	Ölçüldüğü kaynak	PKOS hastalarının sağlıklı kişilere göre oksidatif stres seviyesi
Malondialdehit (MDA)	Serum; eritrosit	Yüksek
İleri glikozillenmiş son ürün (AGEs)	Serum	Yüksek
Ksantin oksidaz (XO)	Serum	Yüksek
8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG)	Serum	Düşük
Lipit peroksidasyon (LPO)	Folikül sıvısı; Serum	Yüksek
Protein karbonil	Serum	Yüksek
Reaktif oksijen türleri	Folikül sıvısı; Granüloza hücresi; Mononükleer hücre	Yüksek
Total oksidan kapasitesi (TOS)	Serum	Yüksek
Oksidatif oksidatif indeksi (OSI)	Serum	Yüksek
Homosistein (Hcy)	Serum	Yüksek
Asimetrik dimetil arjinin (ADMA)	Serum	Yüksek
Prolidaz (PLD)	Serum	Yüksek
Nitrotrozin (Ntyr)	Serum	Yüksek
Urik asit	Serum	Yüksek
Neopterin (NEO)	Serum	Yüksek

Oksidatif Stres & İnfertilite



Çizim 1.9.Oksidatif stres ve infertilite arasındaki ilişki

(http://www.slideshare.net/ocfertility/polycystic-ovary-syndrome-pcos?next_slideshow=1)

1.2.4. PKOS ve Kronik İnflamasyon

Kronik düşük-dereceli inflamasyon PKOS'un önemli bir özelliği olarak değerlendirilir ve PKOS patojenez gelişiminde yer alır (Alanbay 2012, Kebapçılar 2014). Sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında PKOS'lu hastalarda; C-reaktif protein (CRP), tümör nekroz faktör (TNF), interlökin-6 (IL-6), interlökin-18 (IL-18), monosit kemotaktik protein-1(MCP-1) ve akut faz serum amiloid A (APSAA) gibi inflamatuvar belirteçlerin arttığı gösterilmiştir (Repaci 2011, Diamanti-Kandarakis 2006, Gonz'alez 2012, Gonz'alez 2009).

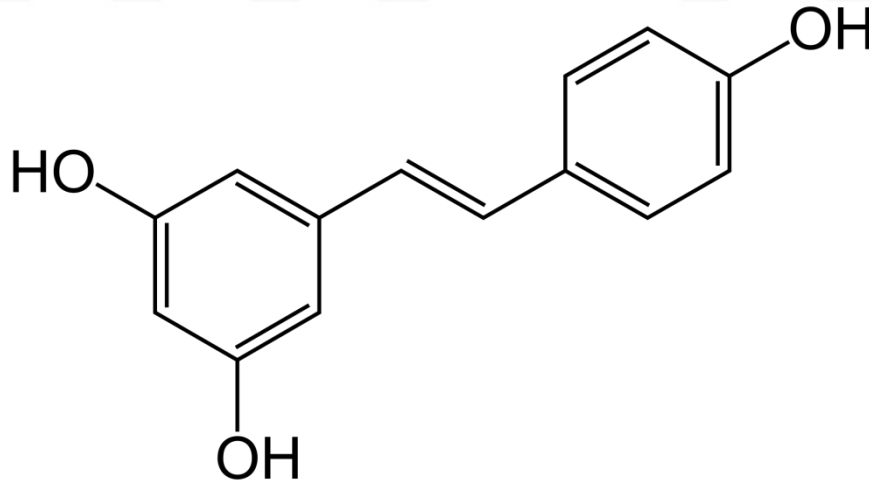
Çeşitli organlardaki fibrotik süreçlerin farklı etiyojisi olmakla birlikte fibrosis tipik olarak kronik kalıcı inflamasyondan köken alır. Hu J. ve ark. (2004) PKOS hastalarının sağlıklı bireylere göre daha yüksek serum TGF- β 1 seviyesine sahip olduğunu ve bunun da fibroziste önemli rol aldığını belirtmiştir (Schiller ve diğ. 2004, Schaafsma ve diğ. 2011, Hu ve diğ. 2004). Buna dayanarak PKOS'ta hiperfibrozisin geliştiği desteklenmektedir.

1.2.5.PKOS, Oksidatif Stres ve Kronik İnflamasyon

Oksidatif stres ve inflamasyon arasında sıkı bir bağlantı olduğu kabul edilmiştir ve inflamasyonu oksidatif stresten tamamen ayırt etmek zordur; genellikle birbirlerine eşlik ederler (Siti 2015). Reaktif oksijen türlerinin; nükleer faktör- κ B (NF- κ B), aktif protein-1 (AP-1) ve hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1) ile ilişkili sinyal yollarını aktive ederek inflamatuvar faktör salınımını ve inflamatuvar cevabı indüklediği gösterilmiştir (Touyz 2005).

1.3.Resveratrol

Resveratrol (3,5,4-trihidroksystilben), molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$, molekül ağırlığı 228,25 dalton olan çeşitli bitkiler tarafından bakteri ve mantar gibi patojenlere karşı fitoaleksin olarak salınan doğal bir polifenoldür. Bu biyoflavonoid en çok siyah üzüm kabuğunda bulunmakla beraber üzümün meyvesinde ve yaprak saplarında, köklerinde, çekirdeğinde, yerfıstığında, yaban mersininde, dut meyvesinde ve oryantal tıbbi bir bitki olan "*Polygonum cuspidatum*" bitkisinin kök ve gövdesinde bulunur (Burkitt ve diğ. 2000).



Çizim 1.10.Resveratrolün kimyasal yapısı (<https://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>)

Epidemiyolojik çalışmalar resveratrolün 'Fransız paradoksuna' olan etkisine dikkat çekmiştir. Doymuş yağca zengin diyetlerine rağmen yüksek miktarda kırmızı şarap tüketmeleri ve düşük kardiyovasküler rahatsızlıklar ile uzun yaşam süresinin gözlemlenmesi bu paradoksu oluşturmaktadır (Liu ve diğ. 2007).

Son on yılda resveratrolün tedavi edici özellikleri üzerine olan ilgi oldukça artmıştır. Resveratrolün anti-inflamatuvar, anti-oksidant, anti-proliferatif, pro-apoptotik ve anti-kanser etkileri bulunmaktadır (Carter ve diğ. 2014, Langcake ve diğ. 1979, Pervaiz ve Holme, 2009). İnsan hücre kültüründe resveratrolün hücre büyümesi, apoptoz ve inflamasyon gibi çoklu yolları modüle ettiği tespit edilmiştir (Athar ve diğ. 2007). Bunların yanı sıra in vitro ve in vivo hayvan modellerinde kimyasalların zararlı etkilerini önleyici (Baribeau ve diğ. 2014), iskemi-reperfüzyon hasarında, nörodejeneratif (Saleh ve diğ. 2014), metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarda (Csiszar 2011) koruyucu etkileri gösterilmiştir. Ancak resveratrolün üreme fonksiyonu ve ovaryum gibi üreme organları üzerine potansiyel yararlı etkileri hakkında bilgiler çok kısıtlıdır.

1.3.1. Resveratrolün Etki Mekanizması

1.3.1.1. Sirtuinlerin Aktivasyonu

Resveratrol birçok hücre hedefle etkileşime girmesine rağmen çoğu etkisi SIRT1 (Sessiz bilgi düzenleyici 1, Sirtuin)'i aktive etmesine dayanır (Borra ve diğ. 2005). SIRT1, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)-bağımlı histon asetilazdır ve ilk keşfedilen aktivitesi kalori kısıtlaması yapılan mayalarda artan yaşam süresine aracılık etmesidir (Guarente ve Picart 2005).

Memeli hücrelerinde SIRT1; p53, FOXO1, PGC-1, karaciğer X reseptörü ve hipoksiyle uyarılabilir faktör-2 (HIF-2) gibi birçok hedefi deasetile ederek enerji homeostazı, lipid metabolizması, gen susturma, genomik stabilite ve DNA onarımı gibi birçok önemli hücresel süreçte yer alır (Qiang ve diğ. 2011, Wilking ve diğ. 2014, Lee ve Goldberg 2013). Ayrıca inflamasyon, karsinogenez, metabolizma modülasyonu gibi çeşitli patofizyolojik olaylarda anahtar rol oynamaktadır (Howitz ve diğ. 2003, Kojima ve diğ. 2008, Ford ve diğ. 2005).

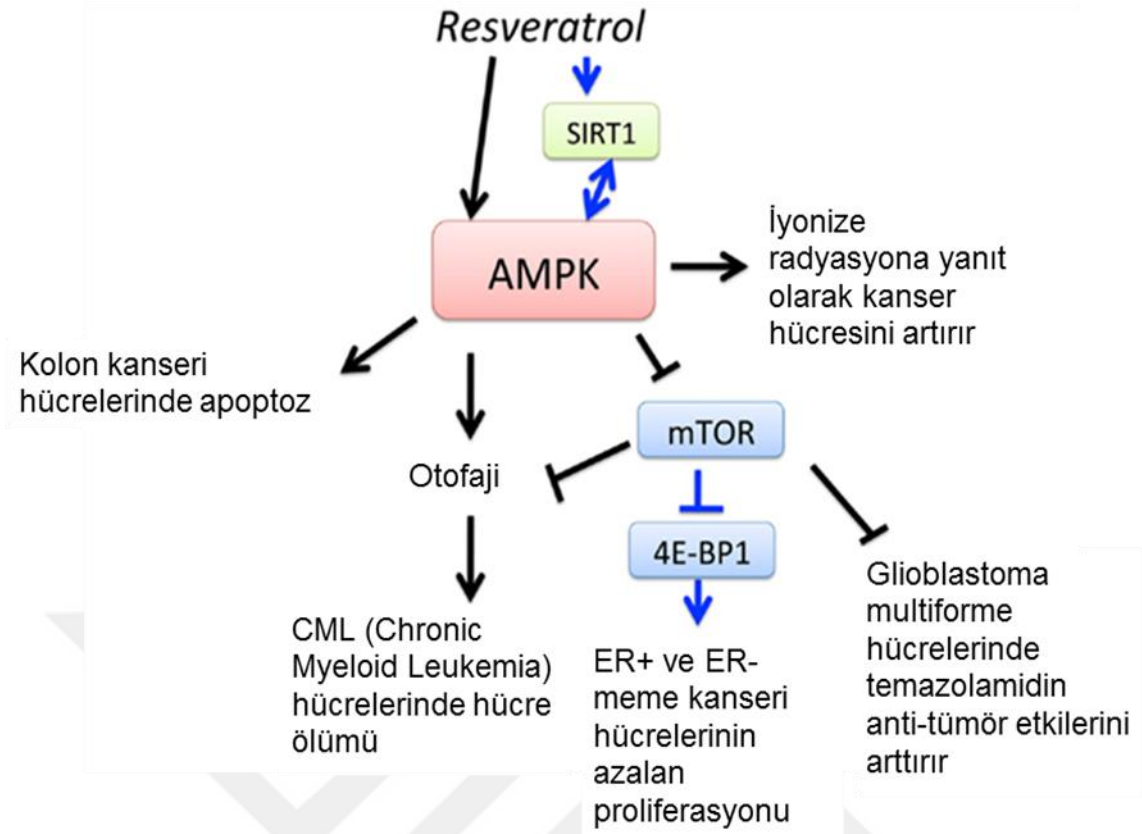
SIRT1 çeşitli hücre tiplerinde inflamasyon gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlar üzerinde inhibitör etki gösterir. Örneğin; aktive olan SIRT1, NIH/3T3 fibroblastlarında TNF- α indüklü inflamasyonu inhibe eder (Zhu ve diğ. 2011). SiRNA-aracılı SIRT1'in susturulması TNF- α uygulanan 3T3-L1 adipositlerinde inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırır (Yoshizaki ve diğ. 2009). Farelerde karaciğer-spesifik SIRT1 susturulduğunda, aşırı yağ içeren besinler, hepatik steatozisi ve inflamasyonu indükler (Purushotham ve diğ. 2009, Pfluger ve diğ. 2008). SIRT1, NF- κ B' nin RelA/p65 alt ünitesini deasetile ederek pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar ve NF- κ B aktivitesini inhibe eder (Yeung ve diğ. 2004). Ayrıca resveratrolün NF- κ B transkripsiyon

aktivitesini bloke ederek anti-inflamatuvar etki gösterdiği de belirtilmiştir (Zhu ve diğ. 2011, Jang ve diğ. 1997, Leonard ve diğ. 2003, Manna ve diğ. 2000, Holmes-McNary ve Baldwin 2000). Bunların dışında SIRT1, enerji ve glukoz homeostazında yer alan çeşitli proteinleri deasetile eder.

Ovaryumda SIRT1, foliküler gelişimin çeşitli evrelerindeki oositte ve granüloza hücrelerinin nükleusunda eksprese edilir. Sirtuinler oksidatif strese ve ovaryan yaşlanmaya karşı hücrel koruma sağlar ve oositleri yaşlanmaya bağlı zarara karşı korur (Tatone ve diğ. 2015). Resveratrol uygulaması ile granüloza hücrelerinde SIRT1-mRNA ekspresyonu ve SIRT1'in deasetilasyon etkisi artmaktadır; böylece luteal faz eksikliğinde potansiyel olarak yararlı olabilir (Morita ve diğ. 2012). Buna ek olarak SIRT1, domuz ovaryumunda foliküler atrezi sırasında granüloza hücre apoptozunun düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir (Zhao ve diğ. 2014).

1.3.1.2.AMPK'nın Aktivasyonu

Glikoz taşıyıcısı (GLUT)-4 translokasyonunun ve artan glikoz alımının, resveratrolün AMPK aktivasyonu aracılığıyla olduğu rapor edilmiştir (Sang ve diğ. 2009). SIRT1 ve AMPK arasında iki yönlü etkileşim bulunmaktadır ve bu da ortak aktivasyona yol açmaktadır (Salminen ve diğ. 2011, Lan ve diğ. 2008). Sirtuinlerden olan SIRT1 ve SIRT3, glikoz ve lipid metabolizmasının düzenleyicisi olarak bilinmektedirler. Onların aktivasyonu AMPK tarafından aktive olan aynı yolakta buluşur (Canto ve Auwerx 2009), artan mitokondriyal biyogenez ve yağ asidi oksidasyonu ile sonuçlanır. Sırasıyla AMPK ve SIRT1 bu mitokondriyal biyogenezde esas düzenleyici olan PGC-1a'nın downstreami üzerinde etki gösterir. Tip II diabetes mellitus gibi lipid ve glikoz metabolizmasının bozulduğu hastalıklarda AMPK ve sirtuin modülatörleri tedavide kullanılabilir.



Çizim 1.11.SIRT1 ve AMPK arasındaki ilişki (Kim ve He 2013)

1.3.1.3.NF- κB'nin İnhibisyonu

Nükleer faktör-κB (NF- κB), transkripsiyon faktörleri ailesidir ve karsinogenezde, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında kritik rol oynamaktadır (Karin ve diğ. 2002). Resveratrolün tümör nekroz faktörü indüklüyerek NF- κB aktivasyonunu engellemesi, onun anti-inflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-karsinojenik etkileriyle alakalıdır (Manna ve diğ. 2000).

Domuz ovaryan granüloza hücrelerinde NF- κB/p50 ve NF- κB/p65 alt ünitelerinin varlığı ve SIRT1'in, FSH/NF- κB sisteminde negatif geri bildirim kontrolü sağladığı rapor edilmiştir (Pavlova ve diğ. 2013). Bu nedenle ovaryumda SIRT1 ve NF-κB arasında karşılıklı ilişki olduğu bilinmektedir.

1.3.2.Resveratrolün Ovaryum Üzerindeki Etkisi

Hücre tipine bağlı olarak resveratrolün hem pro-apoptotik (Harati ve diğ. 2015, Wu ve diğ. 2015) hem de anti-apoptotik (Singh ve diğ. 2011, MacCarrone ve diğ. 1999) etki gösterdiği görülmüştür. Wong ve ark. (2010), teka-interstisyel hücre kültüründe resveratrolün apoptoz üzerine etkilerini araştırmıştır; resveratrolün DNA fragmentasyonu

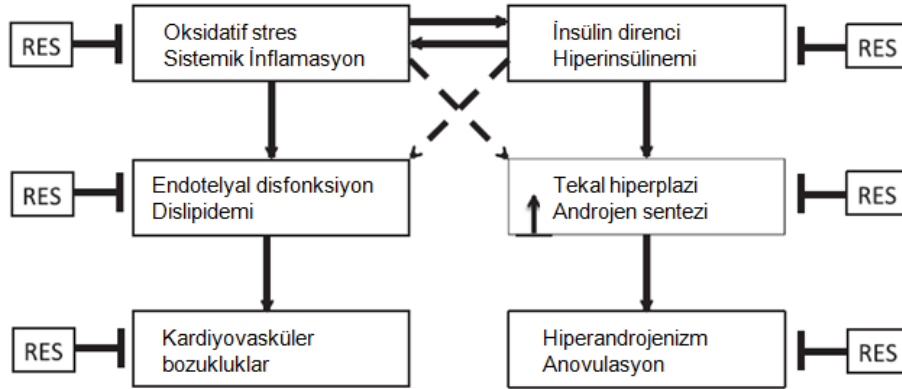
ve kaspaz-3/7 aktivasyonu ile konsantrasyon-bağımlı apoptozun artışı indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca resveratrolün teka-interstisyel hücrelerde apoptozla paralel olarak nükleer büzüşme, kondanse kromatin, hücre iskeleti degradasyonu ve fragmentasyonu gibi zaman ve konsantrasyon bağımlı morfolojik değişiklikleri indüklediği rapor edilmiştir (Wong ve diğ. 2010). Teka-interstisyel hücrelerin proliferasyonu üzerine resveratrol indüklü inhibitör etki, vasküler düz kas hücreleri (Guo ve diğ. 2014), kardiyomyoblast (Leong ve diğ. 2007) ve hepatik stellat (Souza ve diğ. 2008) hücreleri gibi diğer mezenkimal hücreler üzerinde de gösterilmiştir.

Resveratrol granüloza hücrelerinde, teka-interstisyel hücrelerinde gösterdiğinden çok farklı bir etki göstermektedir. Özellikle granüloza hücrelerinde resveratrol, DNA sentezi üzerinde bifazik etki gösterdiği ve düşük konsantrasyonu timidin inkorporasyonunu artırırken, yüksek konsantrasyonunun azalttığı rapor edilmiştir. Dahası, resveratrol canlı granüloza hücre sayısı üzerinde uyarıcı etki göstermektedir (MacCarrone ve diğ. 1999). Bu etki teka-interstisyel hücrelerdeki bulgularla zıt düşmektedir (Wong ve diğ. 2010). Çünkü resveratrol, teka-interstisyel hücrelerde proliferasyon üzerinde potansiyel inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca resveratrolün granüloza hücrelerinde kaspaz-3/7 aktivitesini azalttığı ve hücre morfolojisine etki etmediği rapor edilmiştir. Bu etkiler resveratrolün teka-interstisyel hücrelerdeki potansiyel proapoptotik etkisiyle de keskin bir zıtlık oluşturmaktadır. Bu etkiler ışığında resveratrolün hücre büyümesi ve apoptoz üzerindeki etkileri, tamamen inhibitör değildir ve maruz kalma süresi, konsantrasyon ve hücre tipi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Ortega ve Duleba 2015).

Resveratrolün granüloza hücrelerindeki diğer önemli etkisi ise ovaryan folikülogenezinde önemli rol oynayan ve anjiyogenez ile vasküler devamlılığın potansiyel indüktörü olan VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktörü) üzerine etkisidir (Araujo ve diğ. 2013). Polikistik ovaryumlarda artan stromal kan akımı ile VEGF'in fazla eksprese edilmesinin bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Kamat ve diğ. 1995). Buna ek olarak VEGF, ovaryan hiperstimulasyon sendromu (OHSS) gibi patofizyolojik olaylarda önemli bir araçtır. OHSS, belirgin ovaryum genişlemesi ve damar içindeki sıvının damar dışına çıkması ile karakterizedir. PKOS'lu kadınlar gelişen OHSS riski taşımaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar, resveratrolün sıçan (Ortega ve diğ. 2012) ve domuz (Basini ve diğ. 2010) granüloza hücreleri ile birçok insan kanser hücre hatlarında (Yang ve diğ. 2011, Yu ve diğ. 2010) VEGF ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bu sayede resveratrolün; aşırı VEGF aktivitesiyle ilişkili olan OHSS, anormal anjiyogenez ve endometriyozis gibi

jinekolojik bozukluklarda tedavi amaçlı uygulanabileceği gösterilmiştir (Ortega ve Duleba 2015).

Resveratrolün, ROS üretimini azaltarak oositi metil-glikoksal indüklü sitotoksiteden koruduğu rapor edilmiştir (Liu ve diğ. 2013). Ayrıca sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün farklı yaş gruplarındaki etkisi değerlendirilmiş ve total oosit sayısını arttırdığı, atretik folikül sayısını azalttığı, primordiyal folikülün gelişen foliküle aktive olmasını ve apoptozu engellediği gösterilmiştir (Kong ve diğ. 2011). Domuz ovaryumu ile yapılan çalışmaya göre resveratrol, küçük antral foliküllerde enerji homeostazı ile oositteki ATP içeriğini arttırmakta ve in vitro SIRT1 aktivasyonu ile de oosit büyümesini iyileştirmektedir (Itami ve diğ. 2015). Ayrıca resveratrolün domuz oositlerini in vitro yaşlanmaya karşı koruduğu ve iğ ipliği defekti ile kromozomların yanlış dizilim sıklığını azalttığı rapor edilmiştir (Ma ve diğ. 2015).



Çizim 1.12.PKOS tedavisinde resveratrolün kullanımı (Ortega ve Duleba 2015)[Yukarı ok: artışı, kesintisiz ok: neden-sonuç ilişkisini, kesintili ok: önerilen yolağı, T sembolü: inhibisyonu işaret etmektedir].

1.3.2.1.Resveratrol ve PKOS

PKOS'ta olduğu gibi, insülin seviyesi ve oksidatif stresteki artış da teka-interstisyel hücrelerin hiperplazisine yol açabilmektedir (Ortega ve Duleba 2015). Önceki in vitro çalışmalar insülinin teka-interstisyel hücrelerde sadece büyümeyi uyarmakla (Duleba ve diğ. 1997) kalmayıp, aynı zamanda bu hücreleri apoptozdan koruduğunu (Spaczynski ve diğ. 2005) göstermiştir. Bazı biyolojik sistemlerde kesin mekanizma net olarak bilinmese de resveratrolün insülin duyarlılığını iyileştirdiği gösterilmiştir (Haohao ve diğ. 2015).

İnsülin uygulanan teka-interstisyel hücre kültüründe resveratrol, insülinin indüklediği hücre proliferasyonuna zıt etki göstermiş ve insülinin anti-apoptotik etkilerini konsantrasyon bağımlı kaspaz-3/7 aktivitesini arttırarak yok ettiği rapor edilmiştir (Wong ve diğ. 2010). Resveratrolün teka-interstisyel hücrelerdeki insülin sinyal yolları için modülör olarak görev yapması, PKOS'ta görülen insülin direnci/hiper-insülinemi ve teka-interstisyel hücre hiperplazisi gibi patolojik oluşumlarla klinik olarak da örtüşmektedir (Ortega ve Duleba 2015).

Teka hücreleri, ürettikleri androjenlerin granüloza hücrelerinde aromataz enzimi sayesinde östrojene dönüşmesi nedeniyle ovaryan steroidogenezinde önemli rol oynamaktadır. Önceki çalışmalarda resveratrolün sıçan Leydig (Li ve diğ. 2014) ve adrenokortikal hücreleri (Supornsilchai ve diğ. 2005) gibi diğer hormon üreten hücre tiplerinde steroidogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Resveratrol, teka-interstisyel hücrelerin androjen biyosentez yolağında görevli enzim olan Cyp17a1'in ekspresyonunu inhibe ederek androjen üretimini engellemektedir (Ortega ve Duleba 2015).

PKOS hastalarında insülinle uyarılmış glikoz alımı SIRT1 ve SIRT3'ün azalan gen ekspresyonuyla ilişkilidir ve bu da PKOS'lu hastalarda tip 2 diyabet riskinin arttığını göstermektedir (Skov ve diğ. 2007, Covington ve diğ. 2013).

In vitro ve in vivo bulgular göstermiştir ki resveratrol PKOS'ta olduğu gibi teka-interstisyel hücre hiperplazisi, aşırı androjen üretimi ve değişen granüloza hücre fonksiyonu gibi durumlarda klinik açıdan önemli olabilir. Kritik olarak önemli ancak halen çözülmemiş durum ise resveratrolün klinik denemelerde uygun dozunun seçilmesidir. Resveratrol konsantrasyonunun sıçan teka-interstisyel hücrelerinde hem proliferasyonu hem de androjen üretimini inhibe etmesi gerekmektedir.

1.3.3. Resveratrol ve Antioksidan Mekanizma

Resveratrolün doğal antioksidan etkisini; ROS artışının azalması, mitokondriyonda oluşan süperoksit radikallerin temizlenmesi ve fenton reaksiyon ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibe olması şeklinde 3 farklı mekanizma üzerinden gerçekleştirmektedir (De la Lastra ve Villegas 2007). Ayrıca resveratrol, SOD ve katalaz gibi hücresel antioksidan sistemlerini arttırır ve mitokondriyonda lokalize olan nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaz (NADPH) enzim aktivitesini ve ekspresyonunu inhibe eder (De la Lastra ve Villegas 2007, Xia ve diğ. 2010). Bunlara ek olarak resveratrolün metal iyonları tutup onların ROS ile reaksiyonunu engelleyip antioksidan görevi gördüğü rapor edilmiştir (Gülçin 2010).

Resveratrol in vitro koşullarda potansiyel antioksidan etki göstermemesine karşın, canlı organizmada etkili bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Mukherjee ve diğ. 2010). Resveratrolün kalp, beyin ve böbrekteki iskemi/reperfüzyon koşullarında oksidatif stresi azalttığı (Cadenas ve Barja 1999, Hattori ve diğ. 2002) ve karaciğerde SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Resveratrolün çeşitli patolojik durumlarda; izole sıçan hepatositlerinde (Yang ve diğ. 2005), etanol-uygulanan (Kasdallah-Grissa ve diğ. 2007); safrası tıkanmış, (Cenesiz ve diğ. 2007); CCl₄ karaciğer hasarı olan (Dani ve diğ. 2008, Rivera ve diğ. 2008); aşırı yağlı beslenen (Bujanda ve diğ. 2008) ve iskemi/reperfüzyon hasarı yapılan sıçanlarda (Gedik ve diğ. 2008, Hassan-Khabbar ve diğ. 2008), antioksidan enzimleri arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca resveratrolün nöronlarda radyasyona bağlı oluşan ROS, oksidatif stres ve apoptoz artışını, SIRT1 proteini aktivasyonu yolu ile azalttığı gösterilmiştir (Li ve diğ. 2014).

1.3.4. Resveratrol ve Kardiyoprotektif Etkisi

Resveratrolün kardiyoprotektif etkisi birçok sinyal yolları üzerinden gerçekleşir; SIRT1 ve AMPK aktivasyonu ve fosfodiesteraz inhibisyonu ile damar fonksiyonunu düzenler ve ateroskleroz, oksidatif stres ve apoptozu azaltarak kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliğinde iyileştirici etki gösterir. Diğer taraftan resveratrolün SIRT1 aktivasyonu ile anjiyogenez gelişimini sağlayarak oksidatif stresi azalttığı ve iskemi/reperfüzyon hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (Chung ve diğ. 2012).

1.3.5. Resveratrol ve Nöroprotektif Etkisi

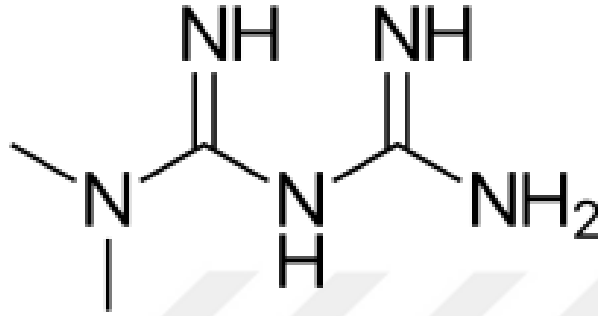
DeneySEL hayvan modelleri ve insanlarda yapılan çalışmalarda resveratrolün Alzheimer, Parkinson, Huntington ve epilepsi hastalıklarında antioksidan özellik ve SIRT1 aktivasyonu yolu ile nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Albani ve diğ. 2010).

1.3.6. Resveratrol ve Antikanser Etkisi

Tümör dokusunda resveratrolün, hücre siklusunun düzenlenmesi, apoptoz, tümör invazyonu ile anjiogenezinin inhibisyonu, inflamasyonun önlenmesi, adenozin monofosfat-aktifleyici protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ve ROS'un temizlenmesi gibi çeşitli mekanizmalar üzerinden antikanser etki gösterdiği bildirilmiştir (Kondratyuk ve diğ. 2011). Resveratrolün meme, kolon, pankreas, mide, prostat, ovaryum, karaciğer, akciğer ve serviks kanseri ve melanom gibi çeşitli kanserlerin proliferasyonunu baskıladığı da gösterilmiştir (Aggarwal ve diğ. 2004, Nobili ve diğ. 2009).

1.4. Metformin

Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride) kristal yapıda, molekül formülü $C_4H_{11}N_5.HCl$ ve molekül ağırlığı 165,63 olan bir maddedir (Dumitrescu ve diğ. 2015). Metformin oral anti-hiperglisemik bir ilaçtır. İlk olarak 1995'te tip II diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmış olup günümüzde bu uygulamaya devam edilmektedir (Kai ve diğ. 2015).



Çizim 1.13.Metforminin kimyasal yapısı (<https://en.wikipedia.org/wiki/Metformin>)

İn vitro yapılan çalışmalar metforminin etkisini AMPK'yı aktive edebilmesi üzerinden gerçekleştirdiği üzerinde durmuştur. AMPK, hücrelerin AMP/ATP durumunu gözlemleyen ve enerji sensörü olarak görev yapan pleiotropik heterodimerik protein kinazdır (Corton ve diğ. 1994, Zhou ve diğ. 2001); aktivasyonu endojen glikoz üretimini baskılar ve lipid metabolizmasını düzenler (Zhou ve diğ. 2001). Ayrıca AMPK aktivasyonu ile kolesterol sentezi, protein sentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Zhou ve diğ. 2001). Stres koşulları altında da anabolik, ATP-tüketen biyosentetik yolları bloke eder (Viollet ve diğ. 2007, Boyle ve diğ. 2010).

PKOS patojenezinde insülin direnci önemli etmenlerden biri olduğundan dolayı PKOS hastalarında insülin duyarlaştırıcı ajanlar uzun zamandır kullanılmaktadır. İnsülin duyarlaştırıcı olarak kullanılan metforminin vücut ağırlığının azalmasına, ovulasyonun düzenlenmesine, hamilelik oranının artması ile hamilelik komplikasyon sayısının azalmasına yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Bargiota ve Diamanti-Kandarakis 2012, Ladson ve diğ. 2011, Diamanti-Kandarakis ve diğ. 2006, Palomba ve diğ. 2005). Metforminin hepatik glukoneogenezi inhibe ederek glikoz ve insülin metabolizmasını düzenlediği çok iyi bilinmesine rağmen ovaryum fonksiyonunu nasıl iyileştirdiği hususu halen net değildir (Stumvoll ve diğ. 1995). Önceki çalışmalar PKOS tedavisinde metforminin, daha çok insülin duyarlaştırıcı veya steroidogenez üzerine olan etkileri

üzerinde durmuştur (Nestler ve diğ. 1996, Tosca ve diğ. 2007, Attia ve diğ. 2001). Metforminin hiperandrojenizm üzerine olan etkisinin; karaciğer tarafından üretilen SHBG (seks hormon bağlayıcı globulin) yapımını arttırarak dolaşımdaki serbest testosteron seviyelerini azaltması sonucu sağladığı bildirilmiştir. Aynı zamanda sitokrom P450c17X aktivitesinin etkisini kısıtlayarak, adrenal androjen üretimini düzenlediği ve ovarian androjen üretimini azalttığı da gösterilmiştir (Barbieri 2003, Jakubowicz ve diğ. 2002). PKOS'lu hastalarda yapılmış bir çalışmada, metformin kullanan hastaların endometriyal proliferasyonunda azalma olduğu ve dolaşımdaki östrojen miktarının normal seviyelere düştüğü gösterilmiştir (Legro ve diğ. 2007). Benzer bir şekilde Randolph JF Jr. ve ark.(1987) ise metforminin PKOS'lu hastalarda hiper-insulineminin neden olduğu aromataz enzim ve lokal östrojen artışına bağlı olarak endometriyal hiperplaziyi ve kanseri önlediği gösterilmiştir (Randolph JF Jr. ve diğ. 1987).

Metformin ile ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalar AMPK aktivasyonu ile ilişkili olan anti-proliferatif mekanizma üzerinde durmuştur (Ning ve diğ. 2010, Tosca ve diğ. 2010). PKOS'ta görülen teka-interstisyel hücre hiperplazisinde metforminin, AMPK aktivasyonu yoluyla androjen üreten hücrelerin kontrolünü sağlayabileceği bildirilmiştir (Martin ve Marais 2012).

Metforminin yan etkileri seyrek olmasına rağmen, hastalarda %30'a kadar varan oranda ishal, kramp, bulantı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlar görüldüğü ve uygulanmasının bırakıldığı rapor edilmiştir. Bu nedenle metforminin uygulanması gereken dozun azaltılacağı yeni stratejiler geliştirilmelidir (Okayasu ve diğ. 2012).

2.AMAÇ

PKOS, üreme çağındaki kadınlarda en yaygın görülen endokrin-metabolik fonksiyon bozukluğudur (Kousta ve diğ. 2005). PKOS patojenezi kesin olarak tanımlanamamakla birlikte hiperandrojenizm, oksidatif stres ve inflamasyon temel nedenleri arasında gösterilmektedir (Murri ve diğ. 2013, Zhang ve diğ. 2012, Lim ve diğ. 2012, DeGroot 2011, Moran ve diğ. 2010). Teka hücreleri, ürettikleri androjenlerin granüloza hücrelerinde aromataz enzimi sayesinde östrojene dönüşmesi nedeniyle ovaryan steroidogenezinde önemli rol oynamaktadır. PKOS'lu hastalarda teka-interstisyel hücre hiperplazisi gerçekleşmekte ve bunun sonucu olarak hiperandrojenizm oluşmaktadır. Hiperandrojenizimli kadınların %70-80'ine PKOS teşhisi konulmuştur (Nisenblat ve Norman 2009). Ayrıca PKOS'lu hastalarda oksidatif stres belirteçlerinin sağlıklı bireylere göre belirgin bir artış gösterdiği (Murri ve diğ. 2013) ve düşük-dereceli kronik inflamasyonun PKOS'un patofizyolojik mekanizması içerisinde yer aldığı rapor edilmiştir (Kelly ve diğ. 2001, Boulman ve diğ. 2004, Xiong ve diğ. 2011). Buna ek olarak PKOS'lu hastalarda C-reaktif protein (CRP), tümör nekroz faktör (TNF), interlökin-6 (IL-6), interlökin-18 (IL-18), monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve akut faz serum amyloid A (APSAA) gibi inflamatuvar belirteçlerin sağlıklı bireylere göre arttığı da gösterilmiştir (Repaci 2011, Diamanti-Kandarakis ve diğ. 2006, Gonz'alez 2012, Gonz'alez ve diğ. 2012, Gonz'alez ve diğ. 2009).

Resveratrol (3,5,4 trihydroxystilbene), bakteri ya da mantar gibi patojen saldırılarına karşı çeşitli bitkiler tarafından fitoaleksinin olarak sentezlenen doğal bir polifenoldür. SIRT1 aktivatörü olan bu biyoflavonoid dut, fıstık, üzüm ve dolayısıyla kırmızı şarapta doğal olarak bulunur (Baur ve Sinclair 2008). Resveratrolün anti-karsinojenik, anti-oksidant, anti-inflamatuvar, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkileri bulunmaktadır (Nassiri-Asl ve Hosseinzadeh 2009, Yousuf ve diğ. 2009). Rubiolo ve ark., resveratrol uygulamasının kültürdeki oksidatif strese maruz kalan hepatositleri antioksidan enzim aktivitesini artırarak etkili bir şekilde koruduğunu rapor etmiştir (Rubiolo ve diğ. 2008). Shin ve ark., resveratrol uygulamasının in vitro karaciğer hücrelerinde apoptozu, ROS üretimini ve glutatyon antioksidan enzim miktarının azalmasını önlediğini göstermiştir (Shin ve diğ. 2009). Bununla birlikte resveratrolün farklı yollara sahip önemli bir antioksidan kapasitesi bulunmaktadır. Resveratrol SIRT1 aktivatörüdür ve SIRT1'in çeşitli hücre tiplerinde inflamasyonu baskılayıcı etkileri görülmüştür. Örneğin; aktive olan SIRT1, NIH/3T3 fibroblastlarında TNF- α indüklü inflamasyonu inhibe etmiştir (Zhu ve diğ. 2011).

TNF- α uygulanan adipositlerde SIRT1 geninin susturulması inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda artışa neden olmuştur (Yoshizaki ve diğ. 2009). Karaciğer-spesifik SIRT1 geninin susturulduğu farelerde yüksek-yagli diyet hepatik inflamasyonu indüklemiştir (Purushotham ve diğ. 2009, Pfluger ve diğ. 2008). Bunun yanı sıra SIRT1, kronik obstrüktif pulmoner hastalık ve kolit gibi kronik inflamasyon hastalıklarında inhibitör etki göstermiştir (Singh ve diğ. 2010). SIRT1'in pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskıladığı ve NF- κ B aktivitesini inhibe ettiği de rapor edilmiştir (Yeung ve diğ. 2004). Resveratrol bazı kanser hücre hatlarında ve primer hücre kültürü sistemlerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiler göstermiştir (Athar ve diğ. 2009, Wong ve diğ. 2010). Ayrıca resveratrol PKOS'lu hastalarda da görülen teka-interstisyel hücre büyümesini, DNA sentezini azaltarak ve pro-apoptotik faktörlerin indüklenmesini azaltarak inhibe etmiştir (Wong ve diğ. 2010). Duleba ve ark. orta dereceli oksidatif stresin teka-interstisyel hücre proliferasyonunda uyarıcı etki gösterdiğini ve buna karşın antioksidanların teka-interstisyel hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Duleba ve diğ. 1997). Ortega ve ark. resveratrolün; simvastatinin in vitro teka-interstisyel hücrelerdeki androsteron ve androsteneidon üretimindeki inhibitör etkisini arttırdığını rapor etmiştir (Ortega ve diğ. 2014). Resveratrol granüloza hücrelerinde ise anti-apoptotik etki göstermiştir (Ortega ve Duleba 2015).

Metformin, Tip II diyabet tedavisinde kullanılan antihiperglisemik bir ilaçtır (Essah ve diğ. 2006). Bu ilacın PKOS tedavisinde de yararlı olduğu kanıtlanmıştır. PKOS'lu hastalarla yapılan klinik çalışmalarda metforminin menstrüel siklusu düzenlediği, hiperinsülinemiği iyileştirdiği ve hiperandrojenemiği azalttığı gösterilmiştir (Essah ve diğ. 2006, Moghetti ve diğ. 2000). Ancak metformin kullanan hastaların % 30'a varan oranda gastrointestinal semptom göstermesi ve PKOS için tam anlamıyla etkili bir tedavi yöntemi olmayışı araştırmacıları yeni arayışlara sokmuştur.

Metforminin, glikoz metabolizması ve insülinin düzenlenmesindeki etkilerini hepatik glikoneogenezisi inhibe ederek gerçekleştirdiği bilinmesine rağmen ovaryum fonksiyonunu iyileştirmedeki mekanizması halen net değildir (Stumvoll ve diğ. 1995). Önceki çalışmalarda metforminin PKOS tedavisinde insülin duyarlaştırıcı etkisine ya da steroidogenez üzerine etkisine bakılmıştır (Nestler ve Jakubowicz 1996, Attia ve diğ. 2001). Günümüzdeki in vitro çalışmalar ise metforminin AMPK aktivasyonu ile ilişkili anti-proliferatif etkileri üzerinde yoğunlaşmaktadır (Ning ve Clemmons 2010, Tosca ve diğ. 2010). AMPK hücre ve tüm vücutta enerji metabolizmasında anahtar düzenleyicidir.

AMP/ATP oranındaki artış AMPK'yı aktive eder ve kolesterol sentezi, protein sentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi tüm olaylar körelir. AMPK ve SIRT1 arasında iki yönlü etkileşim bulunmaktadır ve birbirlerini aktive ederler (Salminen ve diğ. 2011, Lan ve diğ. 2008). Sirtuinler SIRT1 ve SIRT3; glikoz ve lipit metabolizmasının düzenleyicisi olarak bilinirler. Aktivasyonları AMPK ile aktive olan aynı yolda kesişir (Canto ve Auwerx 2009) ve artan mitokondriyal biogenezle sonuçlanır.

Yaptığımız geniş literatür taramasında resveratrolün PKOS üzerindeki etkilerini inceleyen yalnızca bir tane deneysel in vivo çalışma tespit edilmiştir; resveratrol ile birlikte metforminin kullanıldığı bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Yine aynı şekilde resveratrolün PKOS'ta TNF- α seviyesi üzerindeki etkilerine daha önce bakılmamıştır. PKOS'ta yapılan in vitro çalışmalar resveratrolün sıçan teka-interstisyel hücre büyümesini ve insulin-indüklü hücre büyümesini azaltmak için apoptozu indüklediğini ve bu nedenle resveratrolün PKOS tedavisinde yeni bir terapötik ilaç olabileceğini savunmuştur (Wong ve diğ. 2010). Oluşturduğumuz PKOS modelinde resveratrolün SIRT1-AMPK yolu üzerinden antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliği sayesinde PKOS'ta görülen oksidatif stres ve inflamasyonu azaltabileceğini, pro-apoptotik özelliği sayesinde PKOS'ta görülen teka-interstisyel hücre hiperplazisini indirgeyebileceğini düşünmekteyiz. Bu hipotez doğrultusunda PKOS tedavisinde resveratrolün tek başına ve metforminle birlikte ovaryum üzerine etkisini biyokimyasal, immünohistokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik açılardan incelemeyi hedeflemekteyiz. PKOS'un kadınlarda görülen en yaygın metabolik-endokrin hastalık olması ve infertilite sebeplerinden biri olarak gösterilmesi dikkate alındığında, resveratrolün potansiyel terapötik etkileri üzerine odaklanmanın toplum sağlığı açısından yararlı olacağını düşünmekteyiz.

3. YÖNTEM

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 09.07.2015 tarihli ve 7/8-2015 sayılı onay alındı, tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen 64 adet, 35-40 gr ağırlığında, 21 günlük Wistar albino ırkı dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, uygun kafesler içerisinde barındırılarak serbestçe beslenip su içmeleri sağlandı. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca normal pelet yem ve su ile beslendi.

Sıçanlar başlangıçta kontrol ve deney grubu olarak ikiye ayrıldı;

- Kontrol grubu (n=9): 35 gün boyunca 0,2 ml susam yağı subkutanöz olarak verildi. (Xinlin ve diğ. 2013). Daha sonra deney süresi sonlanana kadar herhangi bir işlem uygulanmadı.
- Deney grubu (n=54): 35 gün süresince 0,2 ml susam yağı içerisinde çözünmüş 60 mg/kg/gün Dehidroepiandrosterone (DHEA) subkutanöz olarak verildi. DHEA sıçanlarda, PKOS modeli oluşturmak için uygulandı. (Doz seçimi ve uygulama yöntemi Xinlin ve diğ.'nin (2013) çalışması referans alınarak planlanmıştır). Sıçanların östrus durumu, 35 günlük sürecin son 12 günlük periyodunda (yaklaşık 3 siklus süresi) her sabah standart vajinal smear metoduyla tespit edildi. Vajinal smear günde bir kez, 08:00-10:00 arasında alındı.

3.1.1. Vajinal smear

Fare ve sıçanlarda, insanlardakine benzer olarak, östrus siklusu çeşitli hormonlar ile kontrol edilir. Östrus siklusu; proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürer (Snell 1956, Champlin ve Dorr 1973). Yaklaşık iki gün süren diöstrus fazı boyunca smearda farklı hücreler gözlemlendiğinden, diöstrus 1 (D1) ve diöstrus 2 (D2) olmak üzere iki alt faza ayrılır. Siklusun düzenliliği, aydınlık-karanlık siklusunun kontrolü altındadır. Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının döngüsel değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler meydana getirir. Prolaktin, LH ve FSH proöstrus fazının akşam saatlerinde yükselmeye başlar. Östradiol seviyesi metöstrusta artmaya başlar, proöstrus fazında pik yapar ve östrus fazında tekrar bazal seviyeye ulaşır. Progesteron sekresyonu

metöstrus ve diöstrus fazları süresince yüksektir, diöstrusun ardından azalır. Progesteron değeri ikinci pik seviyesine proöstrus fazının sonunda ulaşır (Campbell ve diğ 1976; Rao ve Kaliwal 2002). Bu hormonal etki ile proöstrus ve östrus fazında ovaryumda folikül gelişimi, östrus fazının ortalarında ovulasyon, metöstrus fazında korpus luteum oluşumu gerçekleşir. Diöstrus fazı ise dinlenme fazıdır (Hubscher ve diğ. 2005).

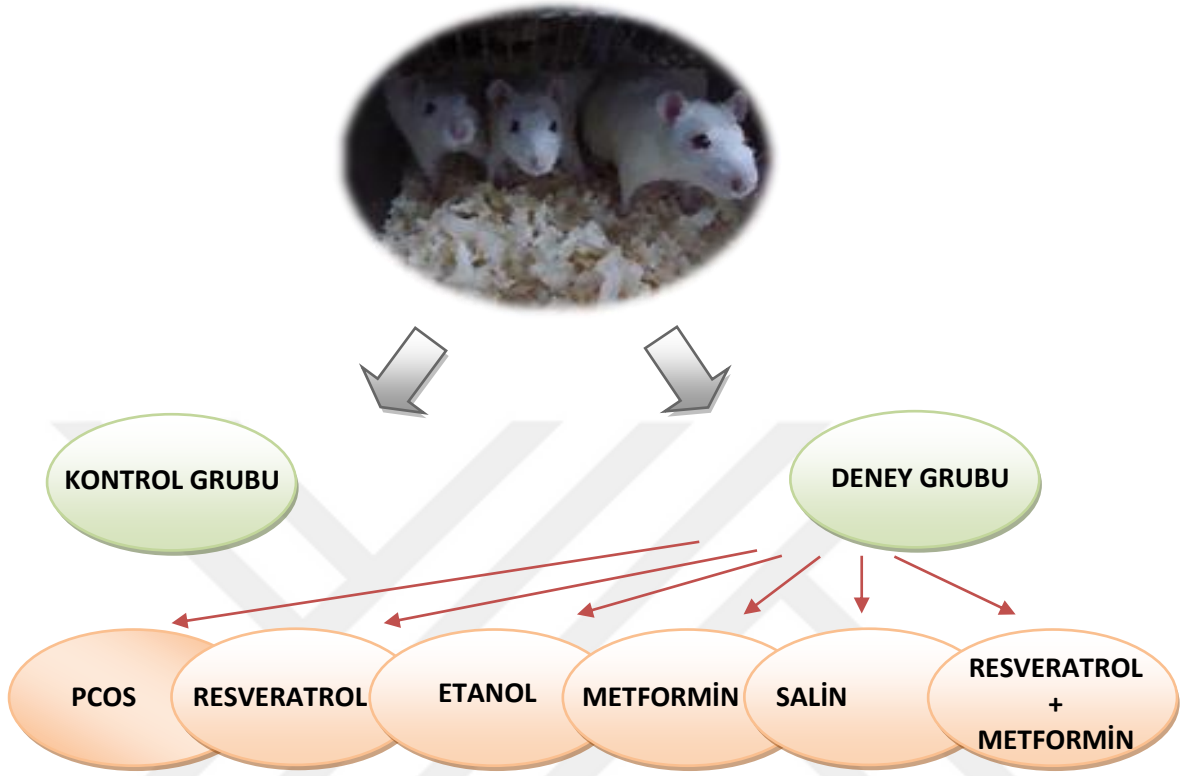
3.1.1.1. Vajinal Yayma Metod

Çalışmamızda pamuklu çubuk yardımıyla vajinal smear alındıktan sonra lam üzerine yayma yapıp kurutuldu. %70'lik etanol ile fiske edilen vajinal yayma örnekleri Papanicolau ile boyanarak incelendi. Epitel hücre çeşitleri ile kornifiye hücrelerin, lökositlerin ve mukusun varlığı incelenip hayvanların östrus durumu tespit edildi (Parhizkar ve diğ. 2013).

Vajinal smear ile düzenli östrus siklusu göstermediği tespit edilen sıçanlar PKOS'lu kabul edildi ve 6 deney grubuna ayrıldı:

1. DHEA grubu (n=9): Bu grubu oluşturan hayvanlara deney süresinin sonuna kadar hiçbir işlem uygulanmadı.
2. Resveratrol çözücü kontrol grubu (n=9): Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına 28 gün boyunca %5 etanol+ %95 salin (resveratrol çözücüsü olduğundan dolayı) intraperitoneal olarak verildi (Seçilen çözücü ve uygulama şekli Erdem T ve diğ. (2012) çalışması referans alınarak planlanmıştır).
3. Resveratrol grubu (n=9): Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına 28 gün boyunca 20 mg/kg/gün resveratrol (%5 etanol + %95 salin içerisinde çözdürülerek) intraperitoneal olarak verildi (Resveratrol doz seçimi ve uygulama yöntemi Soner ve diğ. (2014) çalışması referans alınarak planlanmıştır).
4. Metformin çözücü kontrol grubu (n=9): Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına 28 gün boyunca 1 ml salin (metformin çözücüsü olduğundan dolayı) gavaj yöntemiyle verildi (Doz seçimi ve uygulama yöntemi Xinlin ve diğ. (2013) çalışması referans alınarak planlanmıştır).
5. Metformin grubu (n=9) : Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına 28 gün boyunca 300 mg/kg/gün metformin (1 ml salin içerisinde çözdürülerek) gavaj yöntemiyle verildi (Doz seçimi ve uygulama yöntemi Xinlin ve diğ. (2013) çalışması referans alınarak planlanmıştır).

6. Resveratrol ve Metformin grubu (n=9) : Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına 28 gün boyunca 20 mg/kg/gün resveratrol intraperitoneal ve 300 mg/kg/gün metformin gavaj yöntemiyle verildi (Soner ve diğ. 2014, Xinlin ve diğ. 2013).



Çizim 3.1. Deney gruplarının şematik görüntüsü

3.2. Sakrifikasyon

Deney süresinin sonunda her gruptaki tüm hayvanlar Alfazyne (2.5 mg/kg; i.p) ve Ketalar (12.5 mg/kg; i.p) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak (kardiyak ponksiyon) sakrifiye edildi ve batinları açılarak sağ ve sol ovaryumları alındı.

3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde miktarlarını belirlemek için günlük olarak ve deney sonunda tartılarak kaydedildi.

3.4. Ovaryum Ağırlıklarının Ölçümü

Sakrifikasyonu takiben, çevre dokulardan iyice temizlenen ovaryumların ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı. Sağ ovaryumların yarısı biyokimyasal analizler için salin ile yıkanarak paketlenildi ve kullanılıncaya kadar -40 °C'de saklandı, diğer yarısı elektron mikroskopi incelemeleri için %2,5'lik gluteraldehit çözeltisine alındı. Sol ovaryumlar ışık

mikroskopi incelemeleri için rutin histolojik doku takibi uygulanmak üzere %10'luk tamponlanmış formaldehit içerisinde alındı.

3.5.Biyokimyasal Analiz

Kalpten alınan kan örneklerinde 'KOÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında' serum MDA, FSH, LH ve Testosteron seviyeleri ile plazma AMH ve TNF- α seviyeleri belirlendi. Aynı şekilde ovaryum dokusunda da TNF- α ve AMH seviyeleri tespit edildi.

3.5.1.Doku Homojenizasyonu

Sıçan ovaryumlarında; AMH, TNF- α ve protein tayini için dokular tartılarak üzerine 1/10 (ağırlık/volüm) oranında PBS (0,1 M / pH 7,4) eklenip doku homojenizatörü ile homojenize edildi (Calkins ve diğ. 2001). Homojenatlar 20 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı ve ependorflara alınarak -40°C'de analiz edileceği zamana kadar saklandı. Analiz sırasında çözülerek kullanıldılar.

3.5.1.1.TNF- α ve AMH Tayini

Bioassay (Shanghai, China) ELISA kiti kullanılarak çalışıldı. Çalışma kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

3.5.1.2.Dokuda Protein Tayini

Total protein tayini Lowry modifiye metoduyla yapıldı (Hartree 1972). Analiz ettiğimiz parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak elde edildi.

3.5.2.Kanda FSH, LH, Testosteron, MDA, AMH ve TNF- α Tayini

3.5.2.1. FSH, LH ve Testosteron Ölçümü

Kardiyak ponksiyon ile alınan kan örnekleri pıhtılaşma amacıyla 10-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 2000-3000 RPM'de yaklaşık 20 dk sentrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatlice toplandı. Çıkarılan özüt - 20°C'de muhafaza edildi. Elde edilen serumda FSH, LH ve Testosteron seviyeleri rutin biyokimya otoanalizörü ile ölçüldü.

3.5.2.2.AMH ve TNF- α Ölçümü

Kandan elde edilen plazma örneklerinde TNF- α ve AMH, ELISA kiti kullanılarak çalışıldı. Çalışma kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

3.5.2.3.Malondialdehit Ölçümü

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 535 nm'de maksimum absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu

kompleksin renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülerek, örnek içindeki MDA konsantrasyonu tayin edilir (Buege ve Aust 1978).

3.6. Işık Mikroskopi Uygulamaları

Hayvanlardan alınan sol ovaryumlar ışık mikroskopik takip uygulamak üzere fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonuna konularak fikse edildi ve ardından yükselen dereceli etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24 saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dk süreyle tutuldu ve toluol içinde 30 dk süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56°C'deki etüvde ilk olarak yumuşak daha sonra sert sıvı parafin içinde 45'er dk bekletilen parçalar parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her bir ovaryumdan 10 kesit aralıklarla alınan 10'ar kesit üzerinde hematoksilin-eozin (H+E) ve Masson Trikrom boyaması (Dorostghoal ve diğ. 2011), birer kesit ile de SIRT ve AMPK immünohistokimyası ve TUNEL boyaması yapıldı.

3.6.1.Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme ve Folikül Sayımı

Parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün toluen (2 saat) yardımı ile kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100⁰, 96⁰, 90⁰, 70⁰) geçirildi ve saf suya alındı. Ardından Mayer Hematoksilin'de 5 dk bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyanın giderilmesi için iki kere saf sudan geçirilen kesitler mavileştirme solüsyonunda 10-15 saniye (sn) bekletildi ve tekrar saf suya alındı. Daha sonra %100 etanolden hızlıca geçirilen kesitler sitoplazmik boyanma için Eozin Y solüsyonunda 2-3 dk tutuldu ve tekrar %100 etanole alındı. 3 kez %100 etanol serisinden geçen kesitler toluende ikişer kez 15'er dk bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.6.2.Masson Trikrom Boyaması

Parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün toluol (2 saat) yardımı ile kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100⁰, 96⁰, 90⁰, 70⁰) geçirildi ve saf suya alındı. Kesitler daha sonra Weigert A ve Weigert B hematoksilininden eşit hacimde alınarak hazırlanmış karışımda 5 dk bekletildi. Çeşme suyunda 2 dk yıkanan kesitler saf sudan geçirilerek Asit fuksin solüsyonunda 15 dk tutuldu ve ardından saf sudan geçirildi. Daha sonra Fosfotungstik asit solüsyonunda kollajen liflerdeki kırmızı renk giderilene kadar 10-15 dk bekletilen kesitler yıkama olmadan Anilin mavisi solüsyonuna alındı ve bu solüsyonda 5 dk bekletildi. Saf su ile yıkamanın ardından

%1'lik asetik asit solüsyonunda 3-5 dk bekletilen kesitler hızlıca iki kez %95 alkolden geçirilerek toluenle şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Preparatlar Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile incelendi.

Aynı foliküllerin tekrar sayılmasını engellemek için 5 seviyede bir alınan kesitlerde ayrı ayrı folikül sayımı yapıp toplandı ve total ovaryumdaki ortalama folikül sayısı hesaplandı. Foliküller primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graaf folikülü, korpus luteum, atretik ve kistik folikül olarak sınıflandı ve gruplar arasında folikül sayıları ile bu foliküllerin morfolojik özellikleri değerlendirildi (Gürgen ve diğ. 2013, Medigović ve diğ. 2012, Du ve diğ. 2014, Bulut ve diğ. 2015). Atretik foliküller; granüloza hücre tabakalarında birden fazla piknotik çekirdek, antral kavitede granüloza hücrelerin varlığı, granüloza hücrelerin bazal membrandan ayrılması, dejenere oosit, kalınlaşmış ve dejenere olmuş zona pellusida özellikleri ile ayırt edildi (Dorostghoal 2011). Kistik foliküller ise; geniş, içi sıvı dolu antrum ve granüloza hücre tabaka sayısında azalma olarak değerlendirildi (Du ve diğ. 2014, Bulut ve diğ. 2015).

3.6.3.İmmünohistokimyasal Uygulamalar

Parafin bloklardan alınan seri kesitlerde foliküllerdeki SIRT1 ve AMPK proteinlerinin miktarlarının tayini için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Ayrıca foliküllerdeki apoptotik hücreler TUNEL kiti kullanılarak işaretlendi.

3.6.3.1.SIRT1 İmmünohistokimyası

Parafin bloklardan polilizinli lamalar üzerine alınan 4 µm'lik kesitlerin 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve toluolde 3'er kez 5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Ardından, sırasıyla 2x5 dk 100o alkolde, 1x5 dk 96o alkolde, 1x5 dk 90o alkolde, 1x5 dk 70o alkolde ve son olarak 2x5 dk distile su içinde bekletildi. Kesitler sitrik asit solüsyonu içine alınarak mikrodalgada 10 dk kaynatıldı ve soğuması için 20 dk bekletildi. 2 kez 5'er dakika fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkamanın ardından kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %0,3' lük H₂O₂'de 5 dk bekletildi. 2 kez PBS'de yıkanan lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalem ile çizilerek havuz oluşturuldu.1 kez T-PBS'de yıkanan kesitlere özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 5 dk protein blok solüsyonu uygulandı. Ardından kesitlere 1/100 dilüsyonundaki SIRT1 antikoru uygulandı ve oda sıcaklığında (37°C'lik etüvde) 1 saat bekletilerek primer antikor uygulaması yapıldı (Tao ve diğ. 2015). 3 kez T-

PBS ile yıkama sonrasında 20 dk biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda tutuldu. Üç kez T-PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk horse raddish peroksidaz solüsyonu uygulandı ve yıkama sonrasında kesitlere 5 dk DAB kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 15 sn Mayer hematoksileni uygulanarak zıt boyama yapıldı ve ardından yıkama sonrasında Entellan ile kapatıldı.

Sıçan ovaryumunda SIRT1 pozitif boyanma esas olarak nükleusta yoğunlaşmıştır. Leica DM 1000 ışık mikroskopu ile her bir folikül sınıfındaki hücrelerin nükleuslarındaki SIRT1 ekspresyonunun şiddeti ve yaygınlığı skorlanarak ölçüldü. Boyanma açık sarı ile koyu kahverengi arasında gözlemlendi ve yoğunluğu; 0, renksiz; 1, açık sarı; 2, kahverengi-sarı; 3, kahverengi olacak şekilde skorlandı (Tao ve diğ. 2015). Tanımlanan şiddet değerlerinde boyanan hücrelerin yüzde değeri ile ağırlıklı boyanma şiddetlerinin çarpımlarının toplanması sonucunda H skor hesaplandı [$HSCORE = \sum P_i(i + 1)$]; i, boyanma şiddeti değeri; P_i , boyanan hücre yüzdesi] (Guzel ve diğ. 2011).

3.6.3.2. AMPK İmmünohistokimyası

AMPK için yapılan immünohistokimya uygulamasında SIRT1 immün boyaması sırasında tarif edilen basamaklar izlendi. Kromojen olarak kullanılan AEC 5 dk uygulandı.

Foliküllerdeki granüloza ve teka hücrelerinin sitoplazmasındaki AMPK ekspresyonunun şiddeti ve yaygınlığı semikantitatif H-skor ('Histo' Score / HSCORE) yöntemi ile ölçüldü. HSCORE yönteminde incelemeye alınan parametreler üzerinde; 0 (herhangi bir boyanma yok), 1 (zayıf fakat kontrole göre kısmen boyanmış), 2 (belirgin boyanma var), 3 (yoğun boyanma var) olmak üzere şiddet değerleri belirlendi. Tanımlanan şiddet değerlerinde boyanan hücrelerin yüzde değeri ile ağırlıklı boyanma şiddetlerinin çarpımlarının toplanması sonucunda H skor hesaplandı [$HSCORE = \sum P_i(i + 1)$]; i, boyanma şiddeti değeri; P_i , boyanan hücre yüzdesi] (Guzel ve diğ. 2011).

3.6.3.3. TUNEL Boyaması

Parafin bloklardan alınan 4 µm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından toluolde 3x10 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirilip 5 dk PBS'de yıkandı. Daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K solüsyonu uygulandı ve distile su ile yıkanan (2x2 dk) kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂'de 5 dk karanlıkta bekletildi. PBS (2x5 dk) ile çalkalandıktan sonra lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle

çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 10 dakika oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de terminal deoksinükleotidil transferaz enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma tamponuyla 15 sn çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. PBS'de yıkanan (3x1 dk) kesitlere oda ısısında 30 dk anti-digoksinjenin-peroksidaz konjügatı uygulandı ve yıkama sonrasında 7 dk DAB kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Metil green ile zıt boyama yapılmasının ardından kesitler kapatma medyumunu ile kapatıldı.

Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile tüm folikül çeşitleri incelendi. Sekonder ve Graaf foliküllerindeki teka ve granüloza hücrelerinde görülen immünoaktif nükleuslar ayrı ayrı sayıldı. İşaretlenen hücrelerin toplam hücre sayısına bölünmesi ile foliküllerdeki teka ve granüloza hücrelerin apoptotik indeksi hesaplandı (Kilic ve diğ. 2012).

3.7.Ultrastrüktürel Yöntemler

Geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri için sıçanların sağ ovaryum dokuları alındı ve Millonig tamponlu %4'lük soğuk glutraldehit solüsyonu içerisine kondu. Ardından +4 °C'de 2 gün tespit edildi. Sertleşen dokular, temizlenmiş jilet yardımı ile 1mm3'lük parçalar halinde getirildi. Dokular Millonig tampon ile yıkandı ve 1,5 saat aynı tampon ile hazırlanmış %1'lik Osmiyum tetraoksit (OsO4) ile ikinci tespit yapıldı. 3x15 dk Millonig tamponu ile yıkanan dokular dehidratasyon için 10'ar dk sırasıyla 30°, 50°, 70°, 80°, 96°'lik alkollerden, 15 dk 100° alkolden geçirildi. Dokular 15 dk propilen oksitte bekletildi. Ardından sırasıyla 1:1 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dk, 1:3 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dakikka ve saf aralditte 1 gece bekletildikten sonra yuvarlak plastik kalıplara dökülmüş saf araldit içerisine gömüldü. Kalıplar 24 saat boyunca 45 °C'lik etüvde, 48 saat boyunca 60°C'lik etüvde bırakılarak blokların polimerizasyonu sağlandı. Araldit bloklardan, önce Reichert UM2 mikrotomla 0,5 µ kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyanarak istenilen bölge tespit edildi. Reichert UM3 mikrotomla da 40-50 nm kalınlığında ince kesitler alındı ve bakır grid üzerine yapıştırıldı. Gridlerdeki kesitler %70 etanol ile hazırlanmış doymuş uranil asetat solüsyonu ile 45 dk, ardından Reynol'un kurşun sitratı ile 15 dk boyandı. Jeol Jem-1011 model elektron mikroskobunda incelen kesitlerin fotoğrafları Olympus Veleta TEM CCD kamera ile çekildi. Deney gruplarındaki her bir sıçanın ovaryum dokularında hücrelerin ultrastrüktürel özellikleri araştırıldı.

Teka ve granüloza hücrelerinde nükleus ve organel morfolojisi; kromatin düzeni; mitokondrionların sayısı, bütünlüğü, boyutu, membran yapısı ve krista sayısı; granüllü ve düz endoplazmik retikulum ile zona pellusidanın yapısı; hücreler arası alanın genişliği; sekonder lizozom ve lipit damlacıklarının varlığı; apoptotik ve otofajik hücreler değerlendirildi (Sun ve diğ. 2013, Wang ve diğ. 2012).

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama +/- standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25. persantil - 75. Persantil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA), normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Kruskal Wallis Testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey, Dunnett ve Dunn testleri kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlılık için yeterli kabul edildi.

3.9. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

3.9.1. Kimyasal Malzemeler

Alfazyne (50 ml)

Ketalar (500 mg) (Pfizer: 150086)

Formaldehit (Tekkim)

Ethanol (Merck Millipore: 100983)

Etil Alkol 96 o (Tekkim)

Toluen (Merck Millipore: 108327)

Parafin (Merck Millipore: 107151)

Entellan (Merck Milipore: 107961)

Metanol (Sigma: 24229)

Resveratrol (Santa Cruz: sc-200808)

1,1-Dimethylbiguanide Hydrochloride (Santa Cruz: sc-202000A)

DHEA (Santa Cruz: sc-202573)

Proteinaz K (Merck Millipore: 21627)

Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit (Millipore: S7101)

AMPK α 1/2 antikoru (H-300): sc-25792

SIRT1 antikoru (H-300): sc-15404
Metilen green (TM of Trevigen)
Papanicolau boyası
Hidrojen Peroksit (Merck Millipore: 107298)
HRP Anti-Polyvalent Sekonder Kit (ScyTek: SHP125)
AEC Chromogen Substrate Kit (ScyTek: ACJ500)
DAB Chromogen Substrate Kit (ScyTek: ACH500)
Mayer's Hematoxylin (Labvision: TA-125-MH)
Araldite M (Fluka Analytical: 10951)
Araldite M 960 (Fluka Analytical: 10952)
Araldite M 964 (Fluka Analytical: 10953)
Gluteraldehit (Merck Millipore: 104239)
Osmium tetroxide (EMS: 19134)
Propilen oksit (Merck: 8.07027.1000)
Steril Ahşap Pamuklu Eküvyon Çubuğu (True Line)

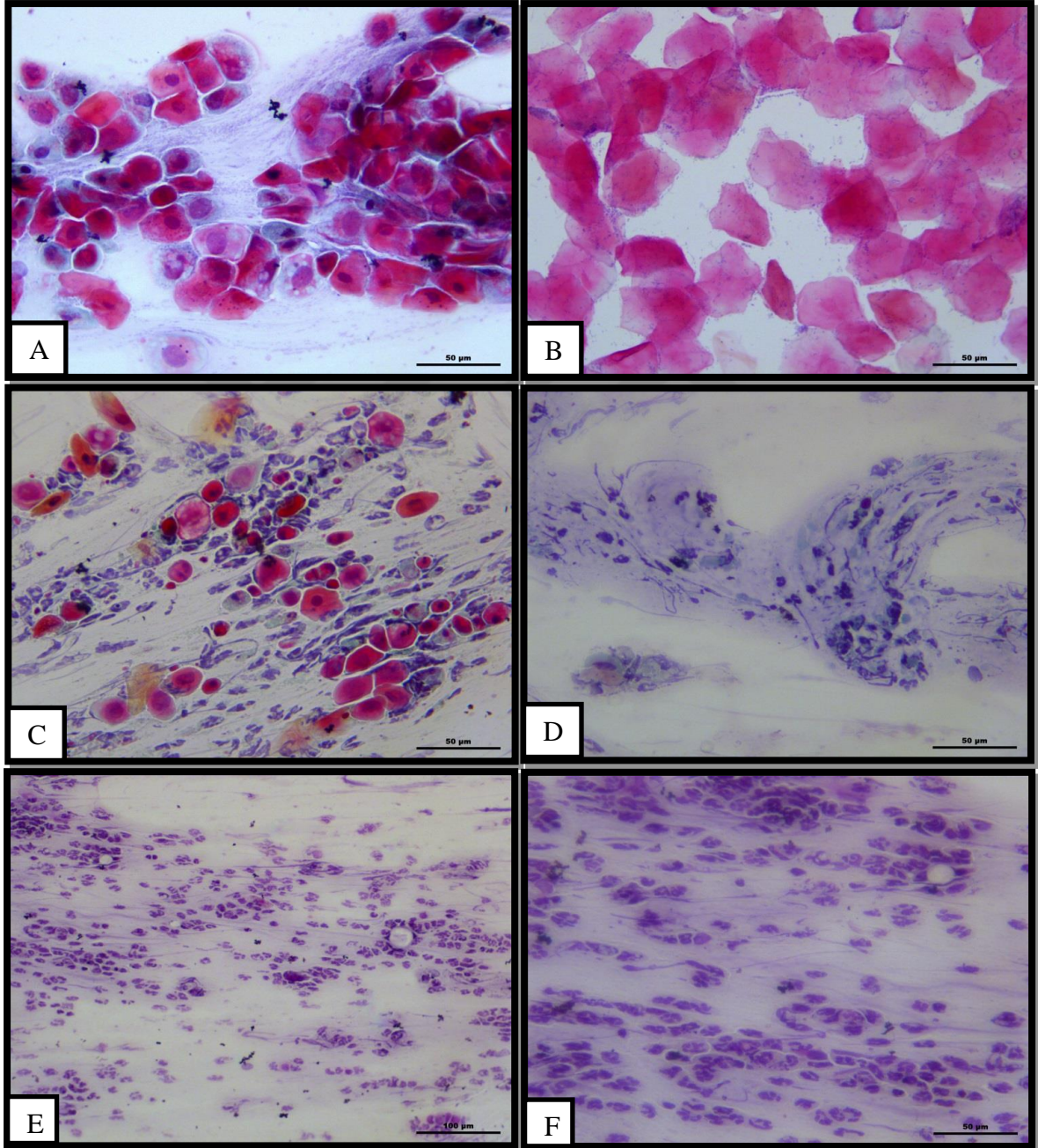
3.9.2. Cihazlar

Alisei Quality System Seac Radim Company analyser (Italy/Rome)-ELISA READER
BECKMAN COULTER DXI-600 otoanalizörü
Buzdolabı (Arçelik)
Hassas terazi (Scaltec-STB31)
IKA T18 Digital ULTRA TURRAX homojenizatör
UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer- SHIMADZU
pH metre (İnolab wtw)
Vorteks (LMS)
Mikrodalga (Regal)
Etüv (Elektro-mag)
Mikrotom (Leica SM 200R)
Işık mikroskobu (Leica DM 1000) ve Kamera (Leica DMC 2900)
Ultramikrotom (Reichert UM2 - Reichert UM3)
Transmisyon elektron mikroskopu (Jeol Jem-1011) ve kamera Olympus Veleta TEM CCD

4.BULGULAR

4.1.Vajinal Smear Bulguları

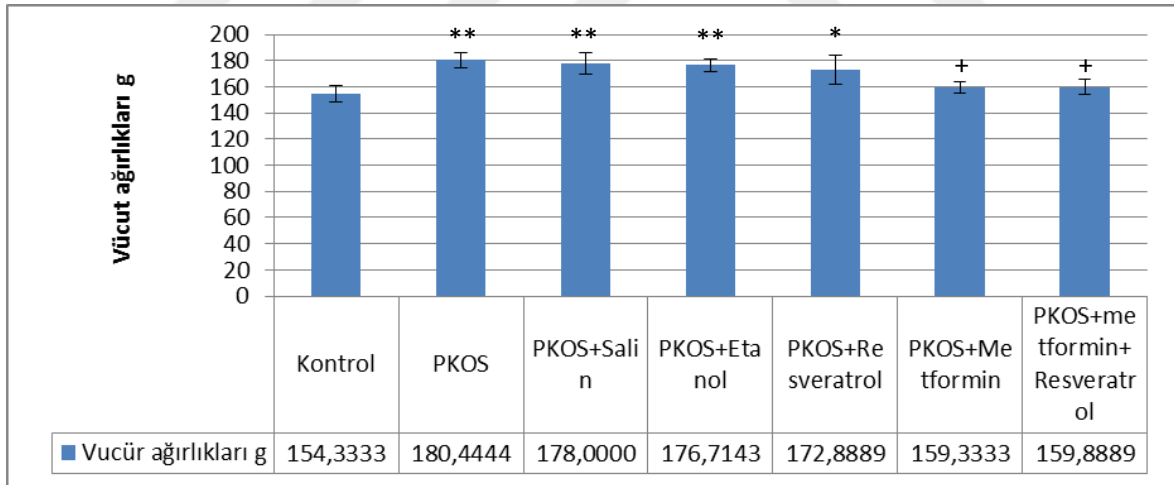
Vajinal smear bulguları PKOS'un başarılı bir şekilde oluşturulduğunu desteklemiştir. Kontrol grubuna ait sıçanlar düzenli estrus siklusu gösterirken, PKOS grubuna ait sıçanlar asiklik ya da düzensiz, uzamış estrus siklusu göstermiştir. Kontrol ve PKOS grubuna ait vajinal smear örnekleri çizim 4.1.'de gösterilmiştir.



Çizim 4.1.Kontrol ve PKOS gruplarına ait vajinal smear örnekleri. Kontrol grubuna ait A,proöstrus; B,östrus; C,metöstrus; D,diöstrus örnekleri. E-F, PKOS grubuna ait diöstrus örnekleri. (A-D, 40X; E, 20X; F, 40X).

4.2.Vücut Ağırlığı

PKOS, PKOS+Salin, PKOS+Etanol ve PKOS+Resveratrol gruplarına ait sıçanların vücut ağırlığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). PKOS grubu ile PKOS+Etanol ve PKOS+Salin grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmezken, diğer tedavi gruplarına göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. PKOS+Resveratrol grubunun vücut ağırlığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş ve PKOS, PKOS+Etanol ve PKOS+Salin grubu ile farklılık göstermemiştir. PKOS+Resveratrol grubu diğer tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. PKOS+Metformin gruplarına ait sıçanların vücut ağırlığı PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol grubu ile anlamlı bir farklılık gösterirken ($p<0.05$), kontrol ve diğer tedavi gruplarıyla anlamlı bir farklılık göstermemiştir. PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait sıçanların vücut ağırlığı Kontrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Resveratrol grubu ile anlamlı bir farklılık göstermezken, PKOS, PKOS+Etanol ve PKOS+Salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0.05$) Vücut ağırlıkları arasındaki anlamlılık (Çizim 4.2)de gösterilmiştir.

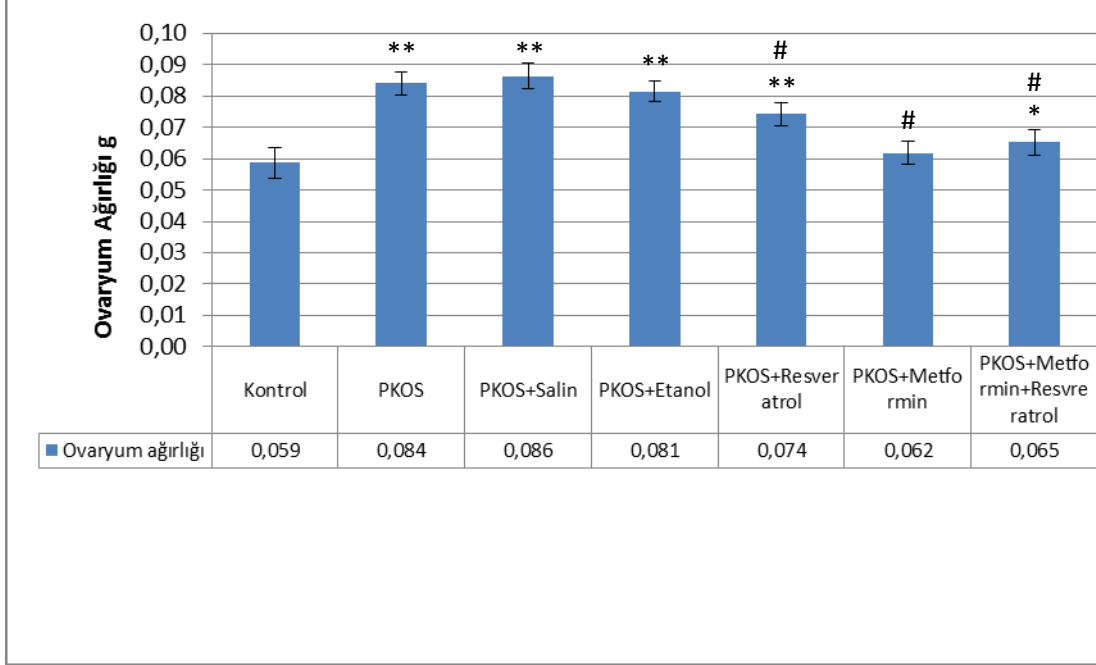


Çizim 4.2.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında vücut ağırlıklarının karşılaştırılması. ** $p<0.001$, * $p<0,005$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. + $p<0,005$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.

4.3.Ovaryum Ağırlığı

Kontrol grubuna ait sıçanların ovaryum ağırlığı diğer gruplarla kıyaslandığında; PKOS+Metformin grubu hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,001$). PKOS grubu ile tedavi grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenirken ($p<0,001$); tedavi grupları kendi içinde kıyaslandığında PKOS+Metformin

grubu ile PKOS+Metformin+Resveratrol grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ancak PKOS+Resveratrol grubu ile görülmüştür. Ovaryum ağırlıkları arasındaki anlamlılık (Çizim 4.3) de gösterilmiştir.



Çizim 4.3. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması. ** p<0.001,*p<0,005; kontrol grubu ile kıyaslandığında. # p<0.001; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.4.Biyokimya Bulguları

4.4.1. FSH, LH, LH/FSH ve Testosteron Seviyeleri

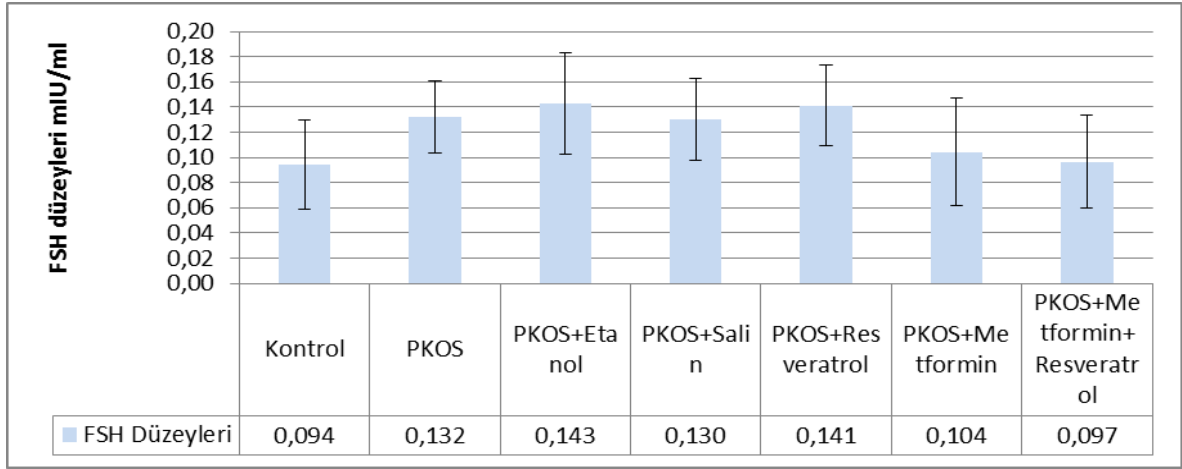
Gruplar arasında serum FSH seviyesine bakıldığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Çizim 4.4).

Kontrol ile PKOS gruplarının serum LH seviyeleri karşılaştırıldığında; PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,001). Kontrol grubuyla tedavi grupları arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmemiştir. PKOS grubuyla tedavi grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (p<0,001). Tedavi grupları kendi arasında kıyaslandığında aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. (Çizim 4.5).

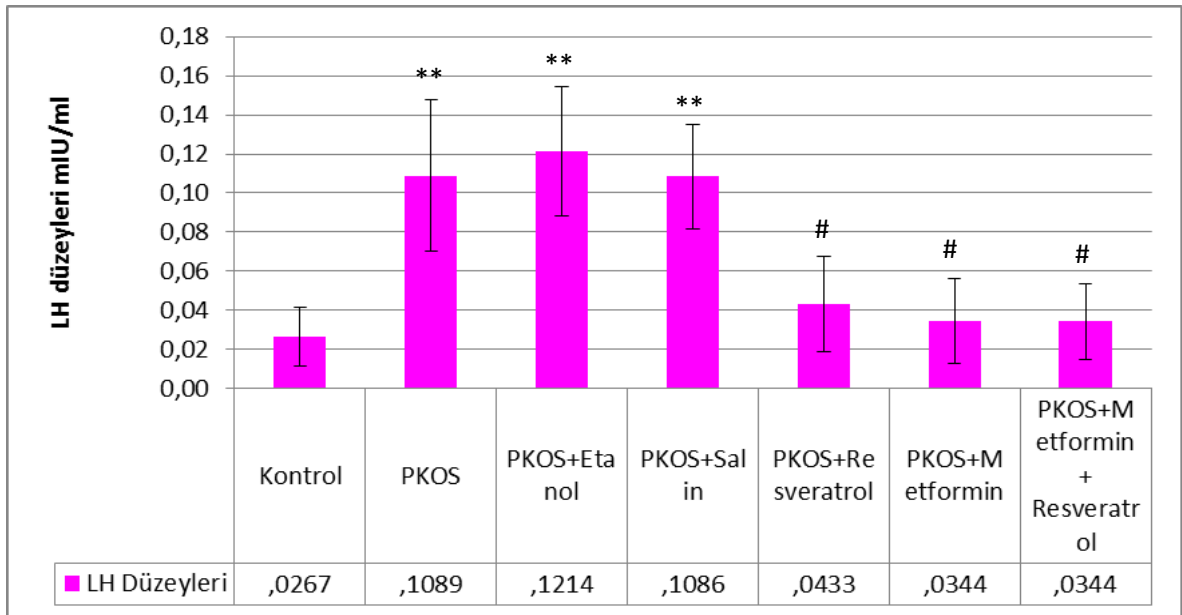
Gruplara ait LH/FSH oranına bakıldığında PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarında bu oranın kontrol grubuna göre artmış olduğu (p<0,05), tedavi gruplarında ise kontrole yakın bir değer aldığı tespit edildi. Tedavi grupları PKOS gruplarıyla

karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,05$) ancak kendi aralarında anlamlı bir farklılık saptanmadı. (Çizim 4.6).

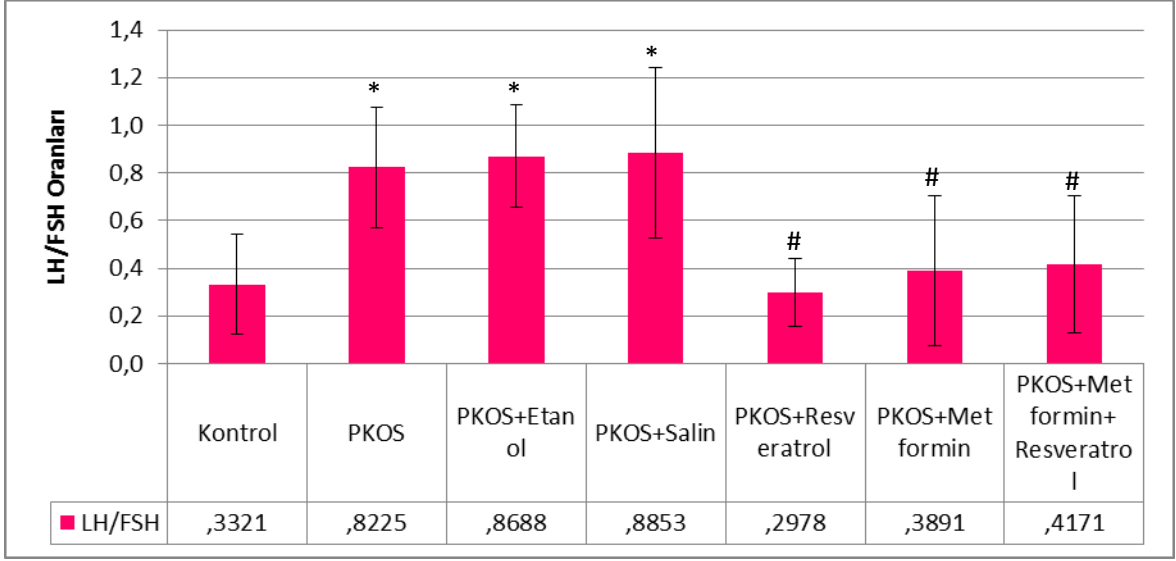
PKOS, PKOS+Salin, PKOS+Etanol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait sıçanların serum testosteron seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak PKOS grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi gruplarının testosteron seviyesini anlamlı ölçüde azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). PKOS+Resveratrol grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Tedavi grupları kendi arasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Çizim 4.7).



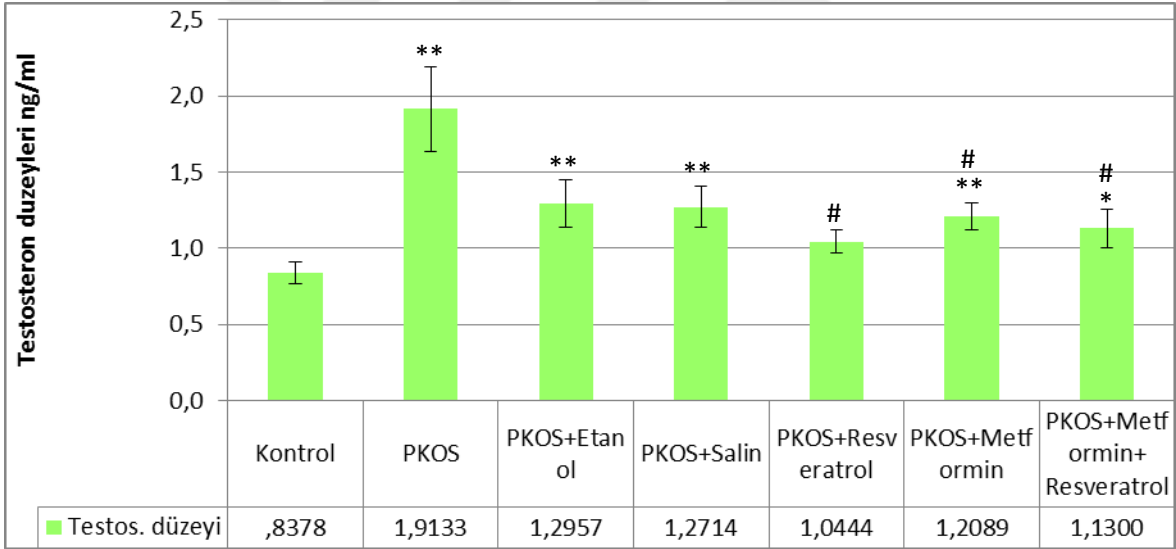
Çizim 4.4. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum FSH seviyelerinin karşılaştırılması



Çizim 4.5. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum LH seviyelerinin karşılaştırılması ** $p<0,001$; kontrol grubu ile kıyaslandığında, # $p<0,001$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.



Çizim 4.6.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum LH/FSH seviyelerinin karşılaştırılması. * $p<0,05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. # $p<0,05$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

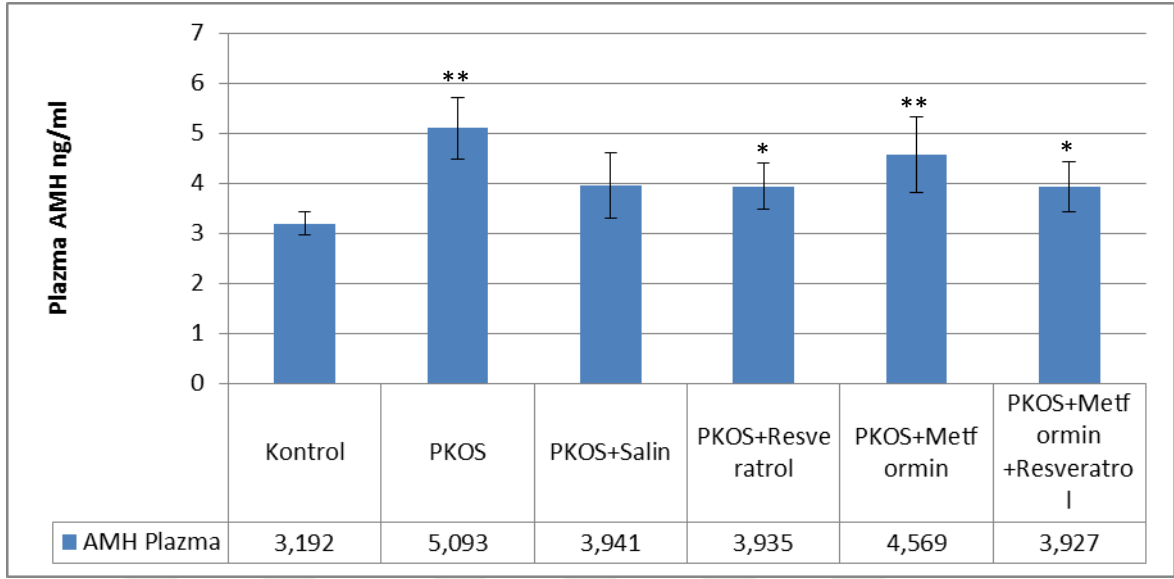


Çizim 4.7.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.** $p<0,001$, * $p<0,05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. # $p<0,001$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.

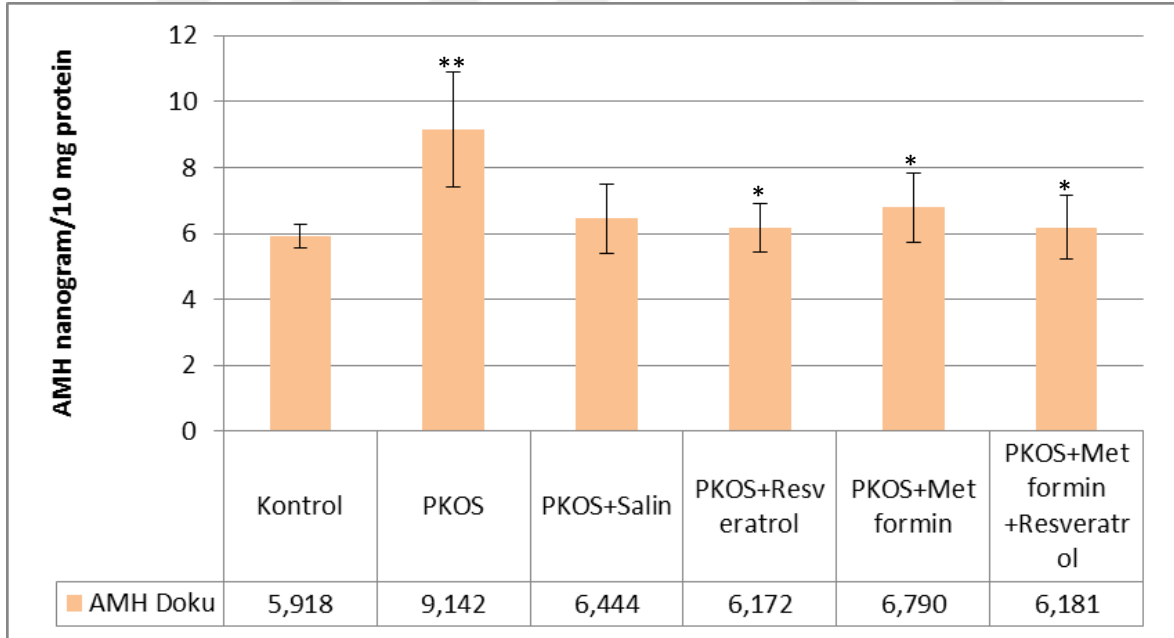
4.4.2. Plazma ve Doku AMH Tayini

PKOS grubuna ait sıçanların plazma ve doku AMH seviyesi; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Plazma AMH seviyesi, tedavi grupları (PKOS+Metformin grubu hariç) ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. PKOS+Resveratrol ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarında PKOS grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tedavi gruplarının doku AMH

seviyesi, PKOS grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir ($p<0,001$). Doku ve plazma AMH seviyeleri birbiriyle paralellik göstermiştir (Çizim 4.8, 4.9).



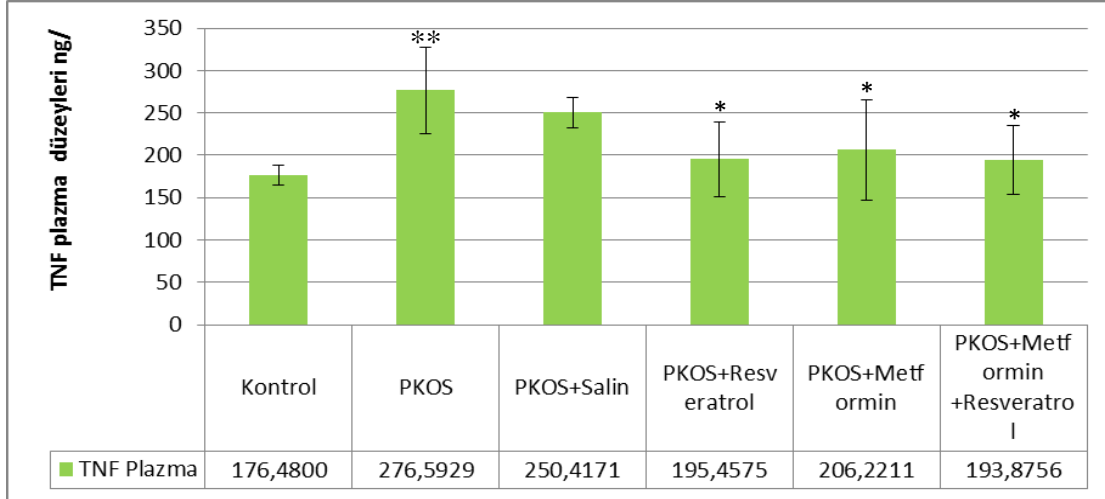
Çizim 4.8.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında plazma AMH seviyelerinin karşılaştırılması. ** $p<0,05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. * $p<0,05$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.



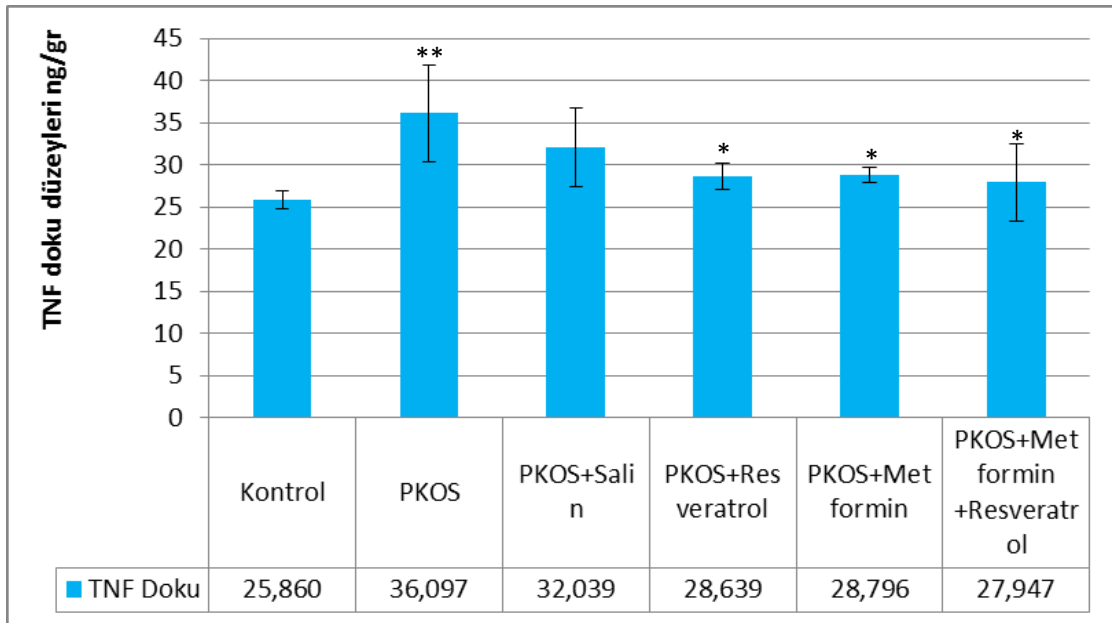
Çizim 4.9.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında doku AMH seviyelerinin karşılaştırılması.. ** $p<0,05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. * $p<0,001$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.4.3. Plazma ve Doku TNF- α Tayini

PKOS grubuna ait sıçanların plazma TNF- α seviyesi; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi içinde veya kontrol grubuyla anlamlı bir farklılık göstermemiştir ancak PKOS grubuna göre anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir ($p<0,05$). Doku TNF- α seviyeleri de bu sonuçlarla korelasyon göstermiştir (Çizim 4.10, 4.11).



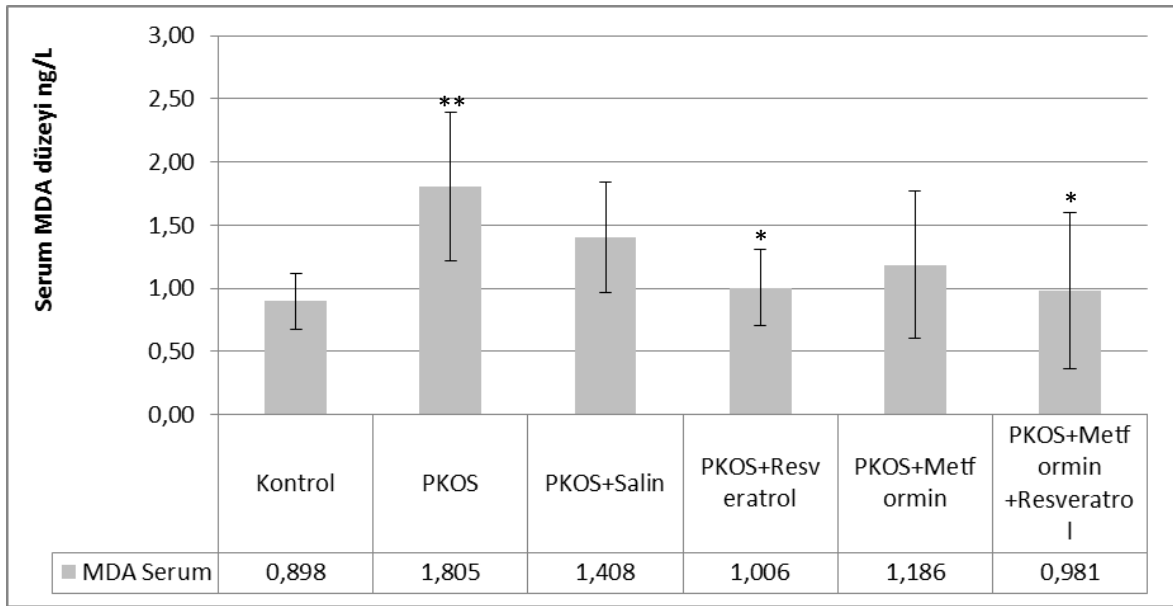
Çizim 4.10. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında plazma TNF- α seviyelerinin karşılaştırılması. ** $p<0,05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. * $p<0,05$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X}) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.



Çizim 4.11. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında doku TNF- α seviyelerinin karşılaştırılması. ** $p<0,001$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. * $p<0,05$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X}) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.4.4. Serum MDA Seviyeleri ile Lipit Peroksidasyonun Tayini

PKOS grubuna ait serum MDA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$). Tedavi gruplarında ise (PKOS+Metformin grubu hariç), PKOS grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.(Çizim 4.12).



Çizim 4.12.Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarında serum MDA seviyelerinin karşılaştırılması.** $p<0.05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında. * $p<0.05$; PKOS grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.5. Işık Mikroskopi Bulguları

4.5.1. H&E Boyaması ve Folikül Sayımı Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ovaryumlarında bulunan foliküller morfolojik açıdan değerlendirildi. Tüm gruplarda folikülogenezin çeşitli evrelerinde olan foliküller gözlemlendi.

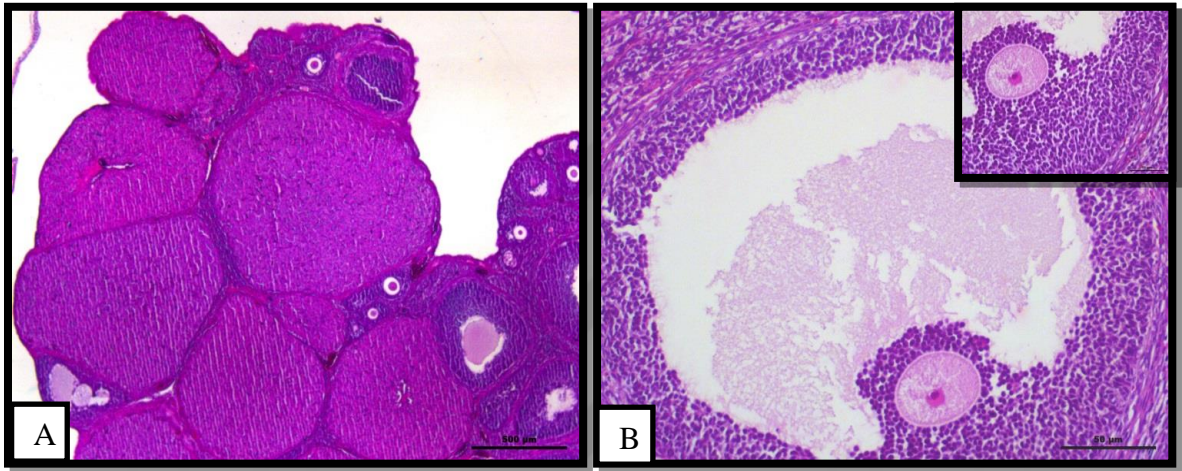
Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal stroma ve olgunlaşmanın farklı evrelerinde birçok folikül ile ovulasyonun göstergesi olan korpus luteum gözlemlenmiştir. Granüloza hücreleri düzgün ve sıkı bir dizilim göstermiştir; olgun foliküllerde genellikle 6-8 sıra granüloza hücre tabakası görülmüştür. Teka hücreleri ise iğsi görünümlü normal dizilim göstermiştir. Teka hücrelerinde hiperplazi gözlemlenmemiştir. Oosit ve oositi çevreleyen zona pellusidada herhangi bir dejenerasyon görülmemiştir (Çizim 4.13).

PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarının genel morfolojisine bakıldığında; stromal hiperplazi, çok sayıda kistik ve atretik folikül ile az sayıda korpus luteum gözlemlenmiştir. Granüloza hücreleri kistik foliküllerde gevşek düzenlenmiştir ve 1-2 sıra hücre tabakasından meydana gelmiştir. Kistik foliküllerin sıvı dolu kavitesinde çok sayıda dökülmüş granüloza hücresi görülmüştür. Daha çok sekonder ve Graaf foliküllerinde olmak üzere, folikülün atreziye gittiğini gösteren piknotik nükleuslu apoptotik granüloza hücrelerine rastlanılmıştır. Apoptotik bulgular TUNEL 'de daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Teka hücrelerinde hiperplazi gözlemlenmiş ve teka tabakasında kalınlaşma meydana gelmiştir. Oosit ve zona pellusidada dejenerasyon görülmüştür (Çizim 4.14, 4.15, 4.16).

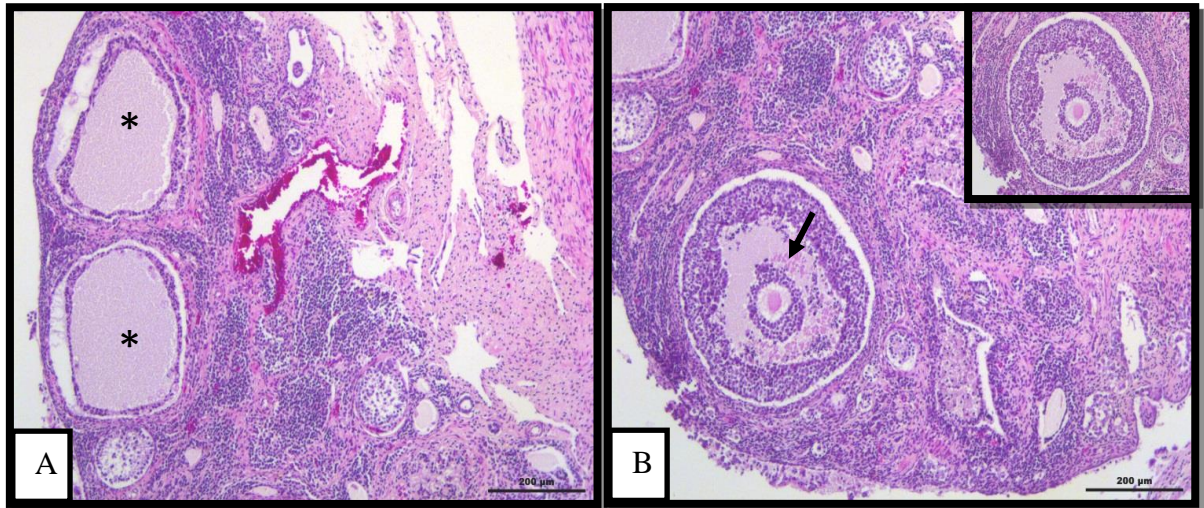
PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarında artan korpus luteum sayısı dikkati çekmiştir. PKOS+Resveratrol ve PKOS+Metformin+Resveratrol grubunda kistik foliküle rastlanmamıştır. PKOS+Metformin grubunda ise az sayıda kistik folikül gözlemlenmiştir. Atretik folikül sayısı tedavi gruplarında PKOS grubuna göre azalmıştır. PKOS+Resveratrol ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarında yer yer apoptotik teka hücrelerine rastlanmıştır. Bu tedavi gruplarında teka hücre hiperplazisi gözlemlenmemiştir. Zona pellusida oositle bütün halde ve normal görünümündedir (Çizim 4.17, 4.18, 4.19).

Morfolojik bulgulara ek olarak histomorfometrik inceleme yapılarak folikülogenezin çeşitli aşamalarındaki folikül sayısı değerlendirildi (Çizim 4.20). Primordiyal foliküllerin sayısı incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p<0,05$); tedavi grupları kendi arasında ve kontrol grubuyla anlamlı bir farklılık göstermezken, PKOS gruplarına göre anlamlı artış gösterdi ($p<0,05$). P. unilaminar ve P.multilaminar folikül sayıları kıyaslandığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.001$). Tedavi grupları, PKOS grubu ve kendi arasında herhangi bir fark göstermedi. Ancak p.multilaminar folikülde tedavi grupları PKOS+Salin grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$). Sekonder folikül sayıları incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi arasında veya kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Graaf folikül sayıları incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$). PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol grupları ise bu durumu düzelterek Graaf folikül sayısında anlamlı bir artış göstermiştir($p<0,05$) ancak tedavi grupları kendi arasında anlamlı farklılık

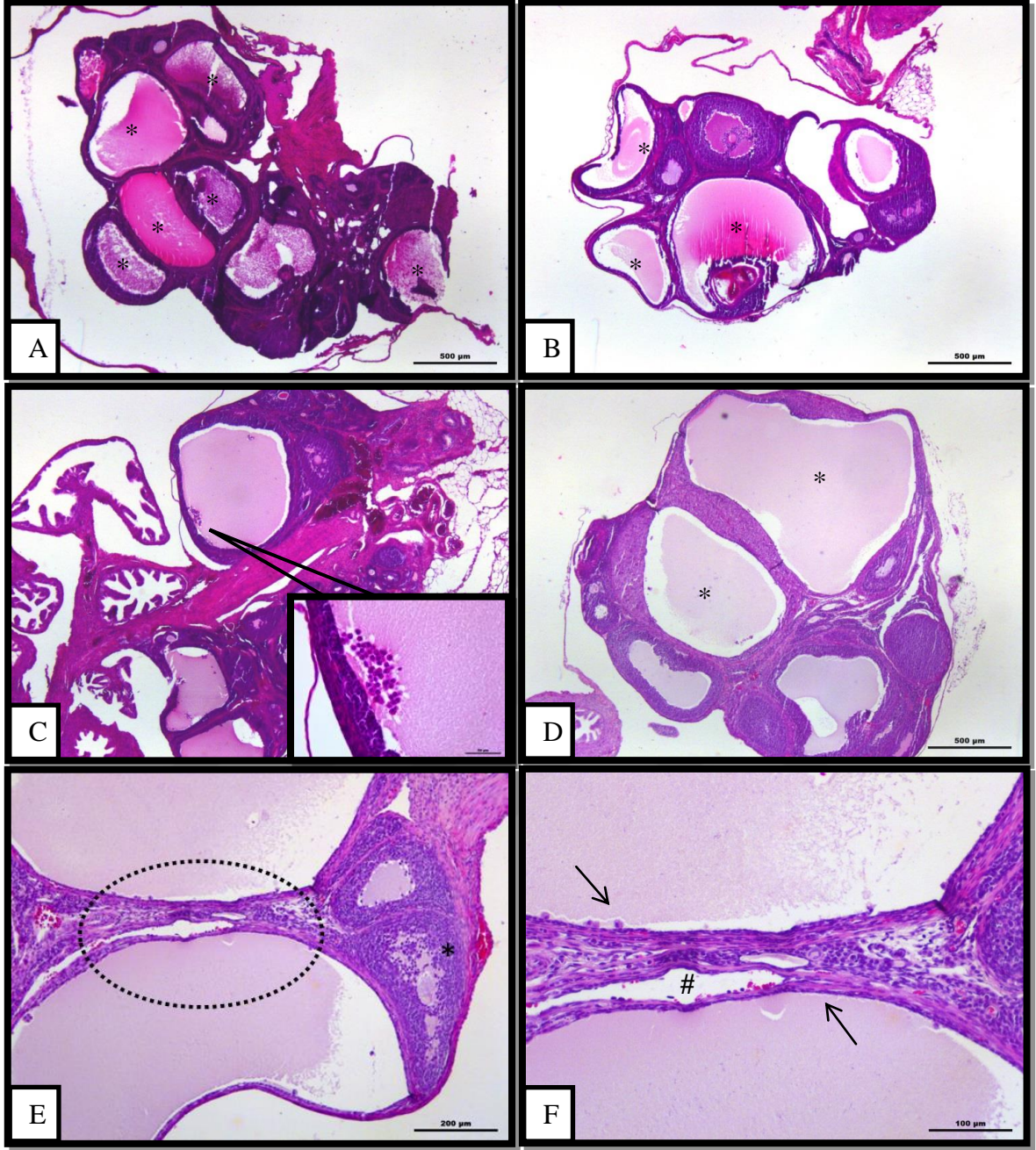
sergilememiştir. Ovulasyon göstergesi olan korpus luteum PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol grubunda PKOS gruplarına göre anlamlı artış göstermiştir($p<0,05$). Kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi içinde de korpus luteum sayısı açısından farklılık göstermemiştir. Atretik folikül sayısı incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla tedavisiz PKOS gruplarında anlamlı artış gözlemlenirken($p<0,05$), tedavi gruplarının bu sayıyı anlamlı azalttığı ve kontrol grubuyla fark göstermediği tespit edilmiştir. PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarında çok sayıda kistik folikül gözlemlenirken Kontrol ve tedavi gruplarında kistik foliküle rastlanmamıştır.



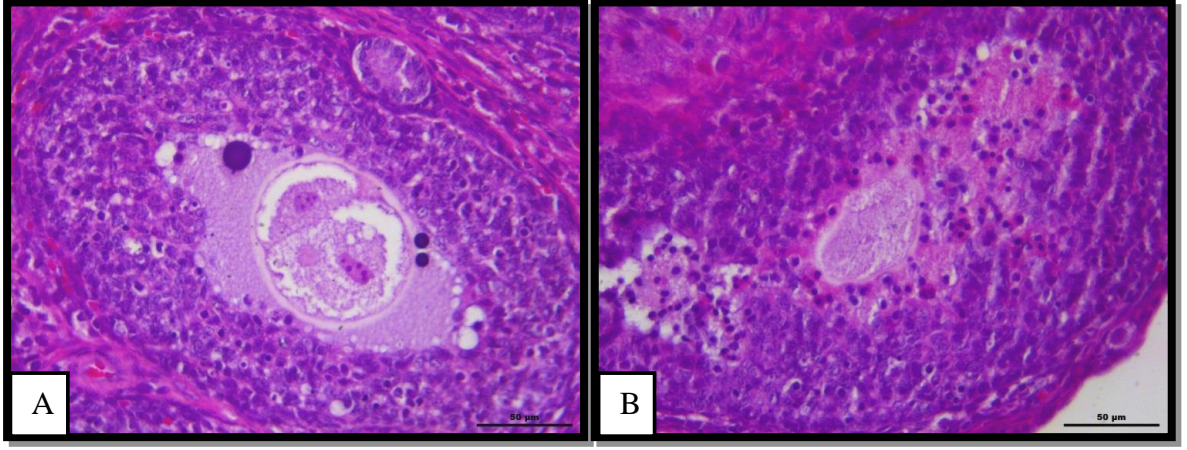
Çizim 4.13.Kontrol grubuna ait H&E mikrografları. A, çok sayıda korpus luteum ve folikülogenezin çeşitli evrelerinde foliküller görülmektedir (4X). B, tersiyer folikül (40X)



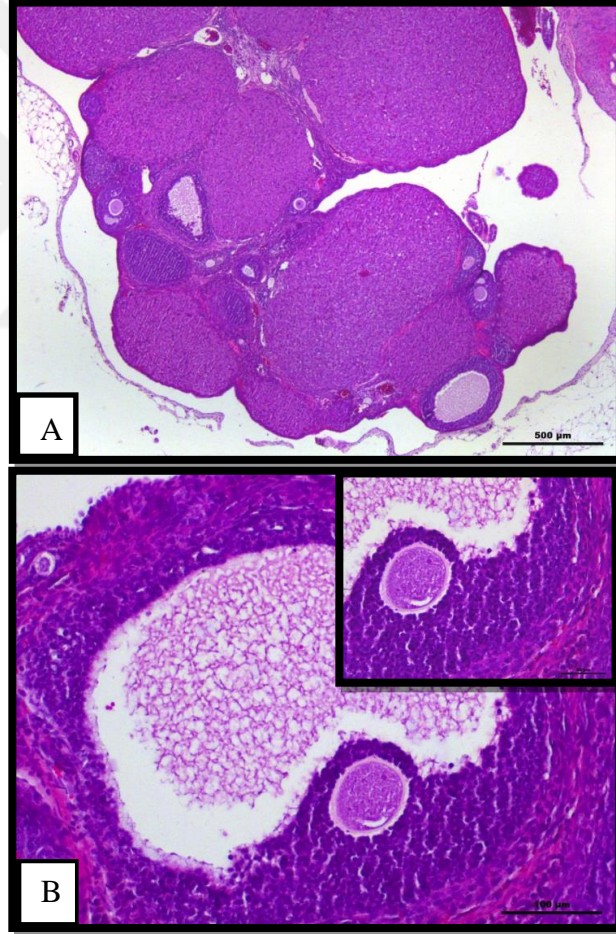
Çizim 4.14.PKOS+Etanol grubuna ait H&E mikrografları. A, kistik foliküllerin(*) görüldüğü genel morfoloji (10X). B, mural granuloza hücreleriyle bağlantısını kaybetmiş oositin (→) görüldüğü atretik folikül (10X).



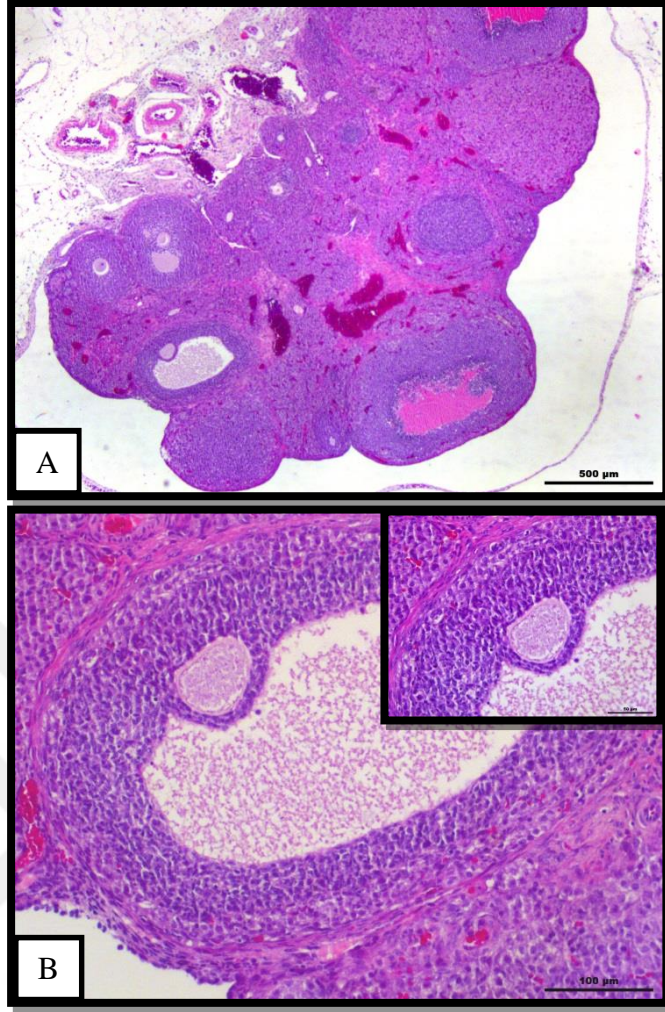
Çizim 4.15.PKOS grubuna ait H&E mikrografları. A-D, kistik foliküllerin(*) görüldüğü genel morfoloji (4X). C’de antruma dökülmüş granuloza hücreleri görülmekte. E’de kistik foliküllerin yanı sıra atretik folikül (*) görülmekte (10X). F, E’de yuvarlak içerisine alınan alanın büyütülmüş hali. Oklar (→) granuloza hücre tabakasının dökülmesine ve geniş kapiller (#) içeren hiperplazik teka tabakasına işaret etmektedir (20X).



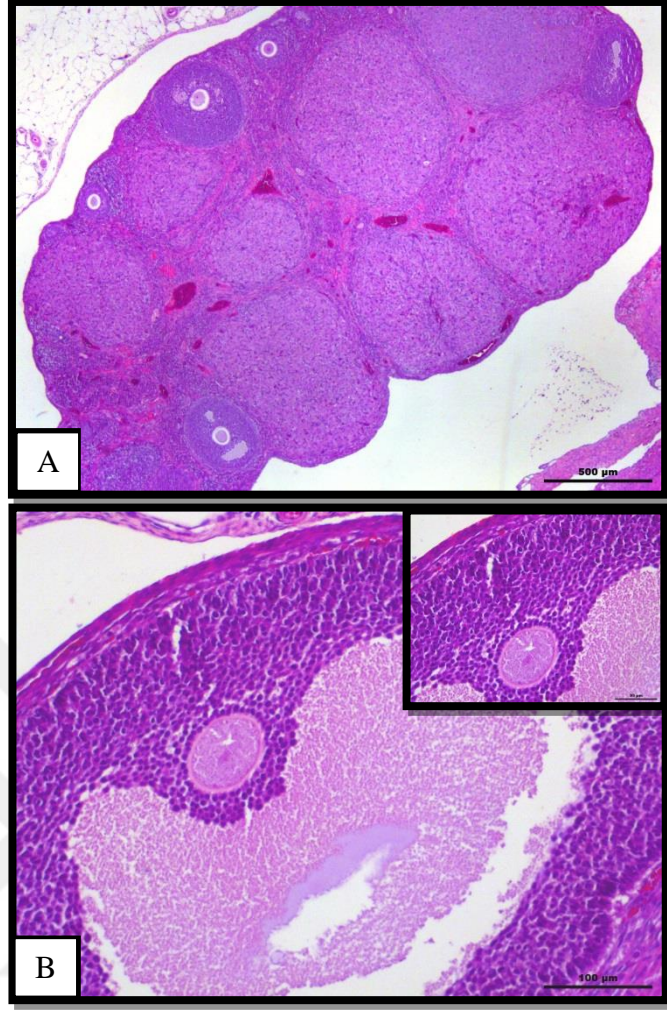
Çizim 4.16.PKOS+Salin grubuna ait H&E mikrografları. A-B, piknotik nukleuslu granuloza hücreleri ile dejenere oosit ve zona pellusida yapısı içeren atretik foliküller görülmektedir (40X).



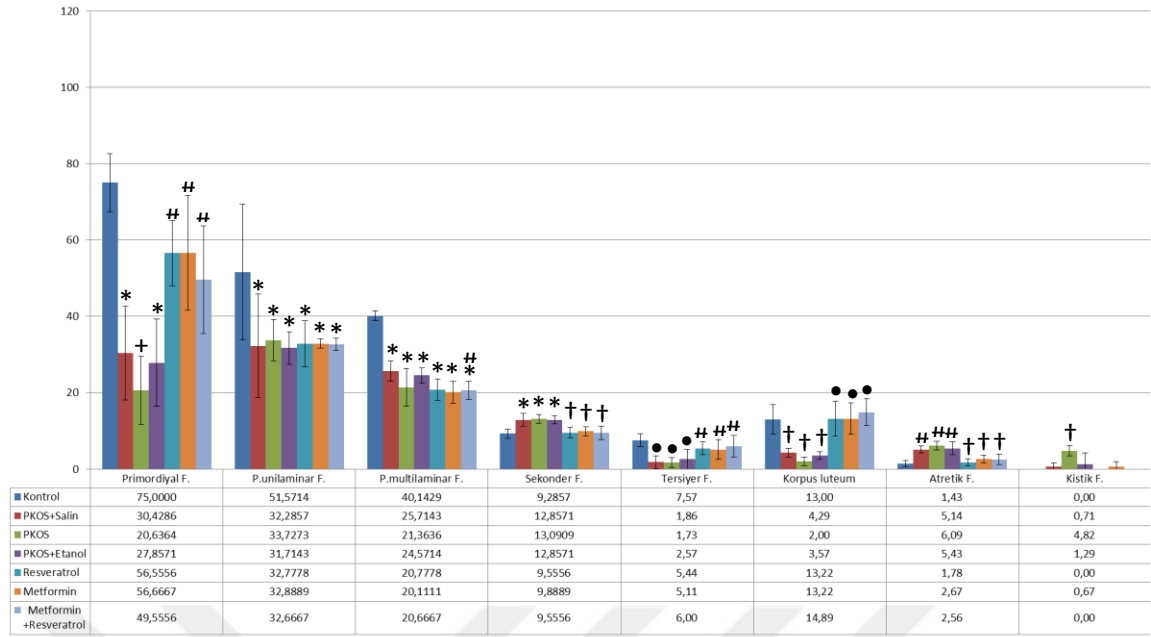
Çizim 4.17.PKOS+Resveratrol grubuna ait H&E mikrografları. A, genel morfoloji (4X). B, tersiyer folikül(40X).



Çizim 4.18.PKOS+Metformin grubuna ait H&E mikrografları. A, genel morfoloji (4X). B, tersiyer folikül (40X).



Çizim 4.19.PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait H&E mikrografları. A, genel görünüm (4X). B, tersiyer folikül (40X).

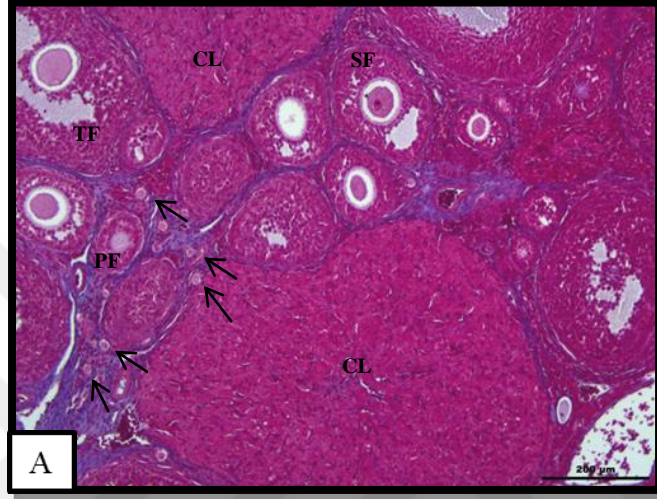


Çizim 4.20. Kontrol, PKOS ve tedavi gruplarındaki primordiyal, p.unilaminar, p.multilaminar, sekonder, tersiyer, korpus luteum ve atretik foliküllerin sayıları. Primordiyal folikül sayısı; $^{\dagger}p<0.001$, $*p<0.05$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. $^{\#}p<0.05$; PKOS grubuyla kıyaslandığında. P.unilaminar folikül sayısı; $*p<0.001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. P.multilaminar folikül sayısı; $*p<0.001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında, $^{\#}p<0.05$; PKOS+Salin grubuyla kıyaslandığında. Sekonder folikül sayısı; $*p<0.001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında; $^{\dagger}p<0.05$; PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarıyla kıyaslandığında. Tersiyer folikül sayısı; $^{\dagger}p<0.001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. $^{\#}p<0.05$; PKOS grubuyla karşılaştırıldığında. Korpus luteum sayısı; $^{\dagger}p<0.001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. $^{\dagger}p<0.001$; PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarıyla kıyaslandığında. Atretik folikül sayısı; $^{\#}p<0.001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. $^{\dagger}p<0.001$; PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarıyla kıyaslandığında. Kistik folikül sayısı; $^{\dagger}p<0.001$; kontrol ve tedavi gruplarıyla kıyaslandığında. Primordiyal ve folikül grubundaki değerler median (25-75 percentile); P.unilaminar, P.multilaminar, sekonder, tersiyer, atretik ve kistik foliküller ile corpus luteum gruplarındaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

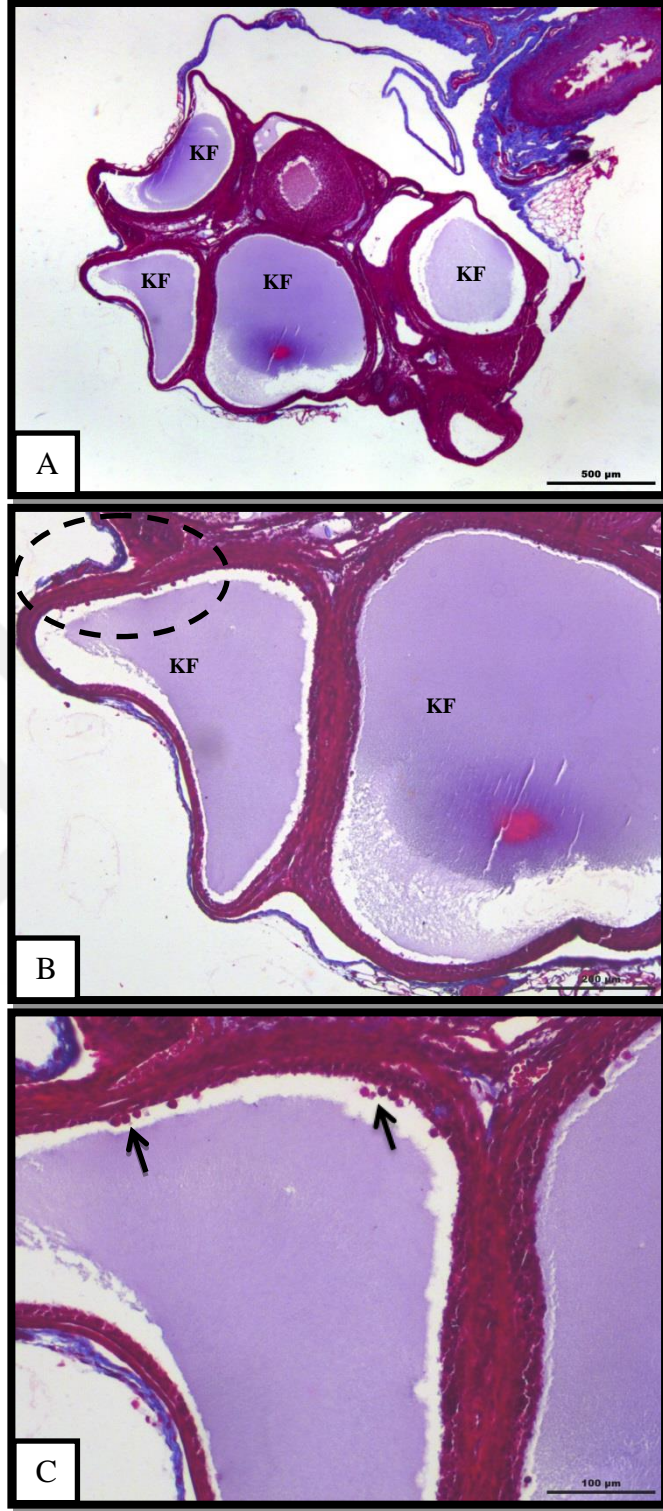
4.5.2. Masson Trikrom Boyama Bulguları

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitleri morfolojik açıdan incelendiğinde; normal bir stroma ve gelişimin farklı evrelerinde sağlıklı foliküller görülmüştür (Çizim 4.21). PKOS, PKOS+Salin, PKOS+Etanol gruplarında ise çok sayıda kistik folikül gözlemlenmiştir. Bu foliküllerde granüloza hücre tabakası hiç yoktur veya 1-2 sraya indirgenmiştir. Folikül boşluğunda çok sayıda dökülmüş granüloza hücresi gözlemlenmiştir. Teka hücre tabakasında ise kalınlaşma ve artan kan damarı sayısı dikkati çekmiştir. Bu gruplarda kistik foliküllerin yanı sıra apoptotik granüloza hücrelerinin görüldüğü çok sayıda atretik folikül

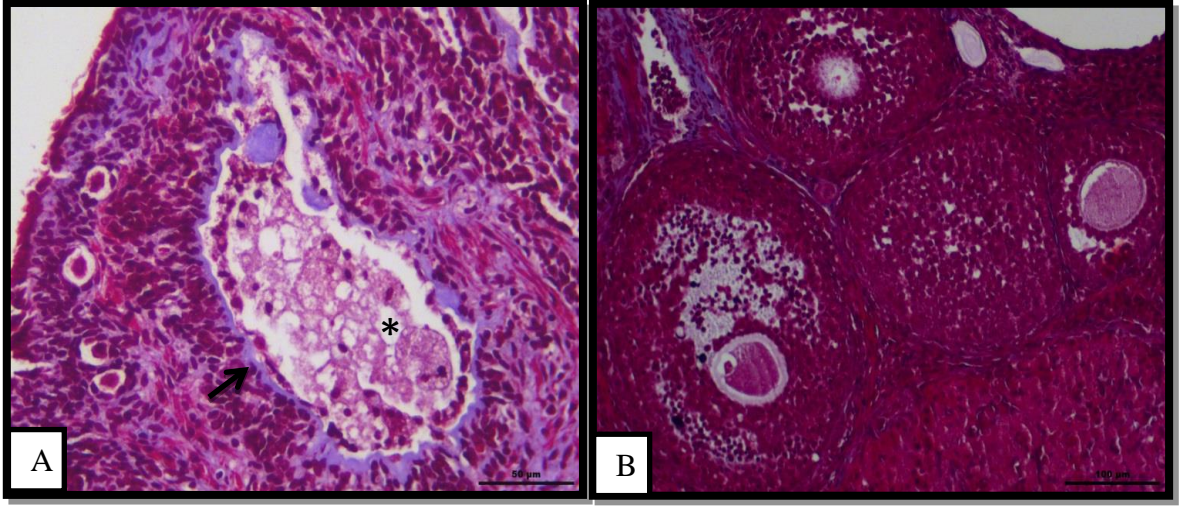
tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla korpus luteum sayısında azalma tespit edilmiştir (Çizim 4.22, 4.23). PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol tedavi gruplarında ise kistik foliküle rastlanmamış ve atretik folikül sayısında belirgin bir azalma görülmüştür. Korpus luteum sayısında artış gözlemlenmiştir (Çizim 4.24, 4.25, 4.26).



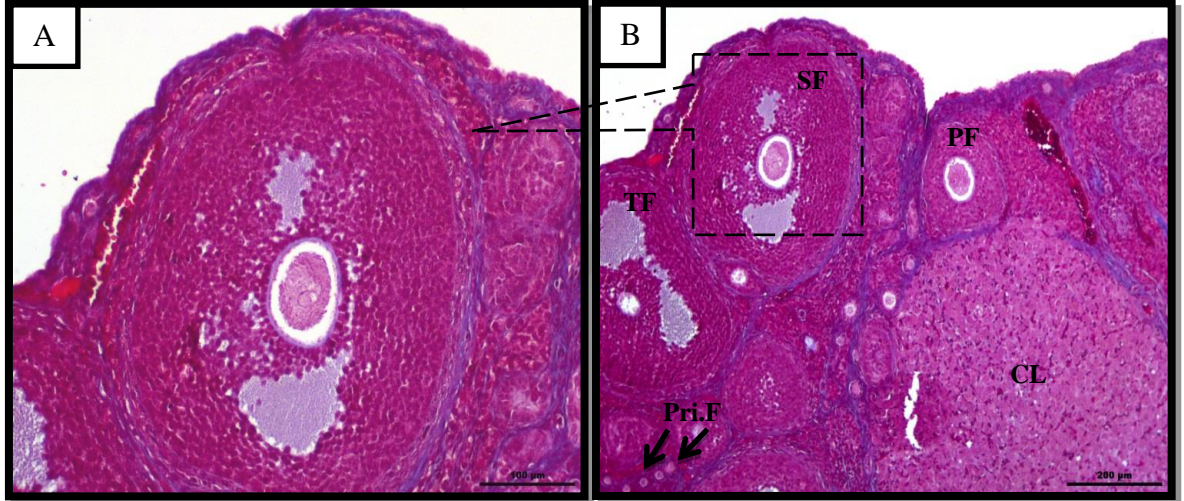
Çizim 4.21. Kontrol grubuna ait MT mikrografi (10X). CL, korpus luteum; SF, sekonder folikül; PF, primer folikül; TF, tersiyer folikül. Oklar (→), primordiyal foliküllere işaret etmektedir.



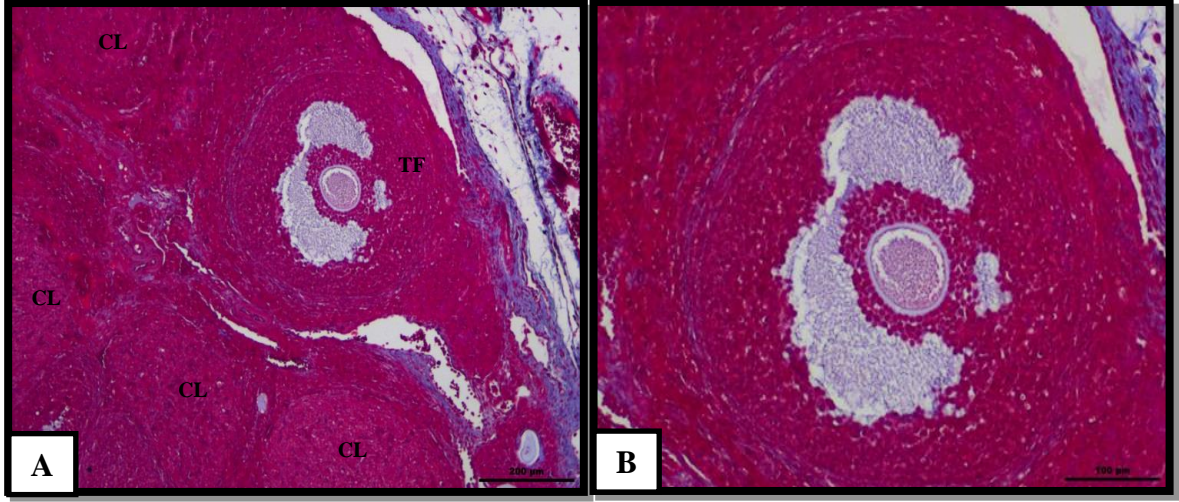
Çizim 4.22.PKOS grubuna ait MT mikrografları. A, kistik foliküllerin görüldüğü ovaryum morfolojisi (4X). B, kistik foliküller (10X). C, B’de yuvarlak içerisine alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü (20X). Oklar (→), dökülen granuloza hücrelerine işaret etmektedir. KF, kistik folikül.



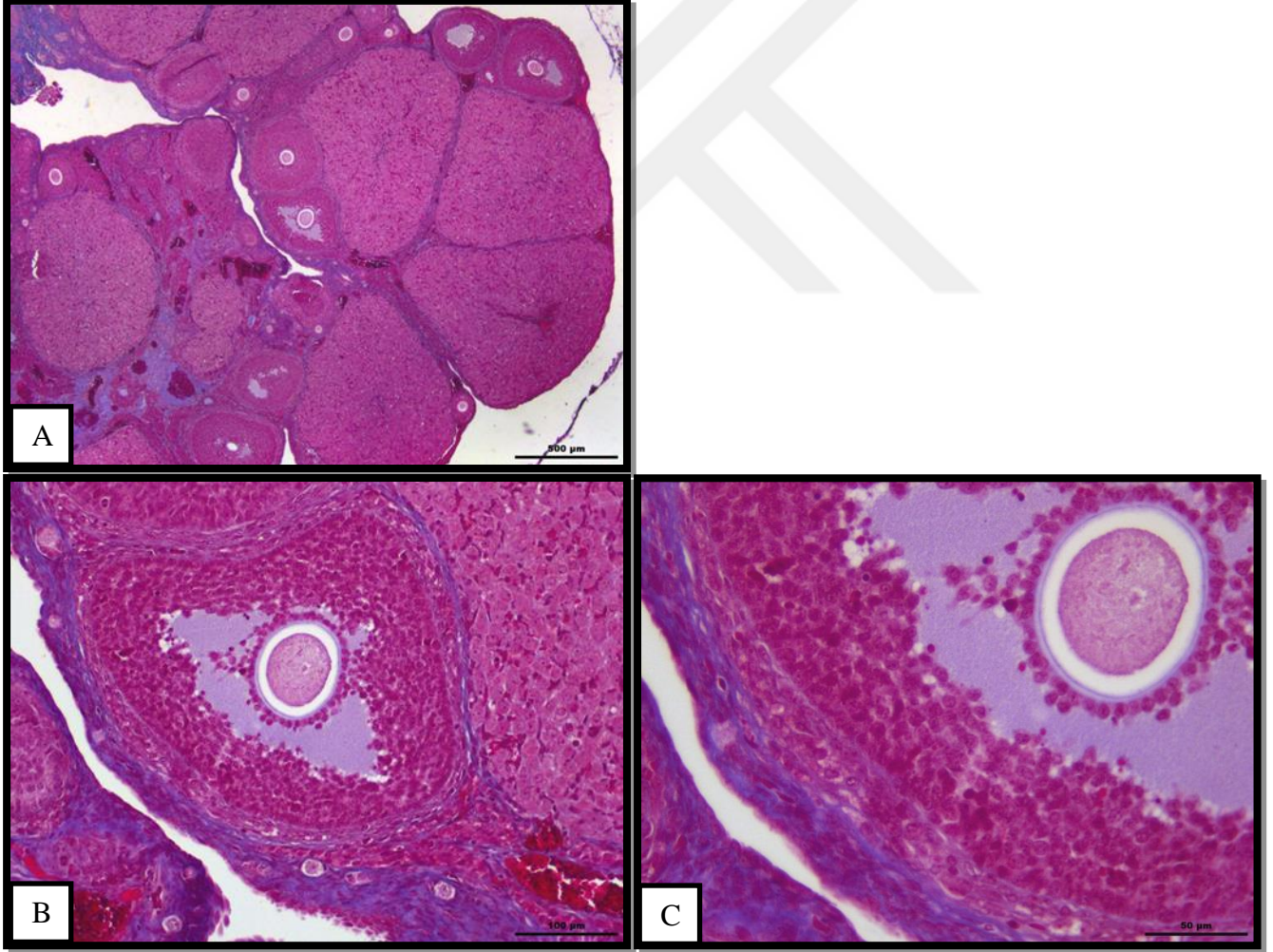
Çizim 4.23. A, PKOS+Etanol ve B, PKOS+Salin gruplarına ait MT mikrografları. A, dejenere olmuş zona pellusida (→) ve piknotik nukleuslu granuloza hücreleri içeren atretik folikül (*) (40X). B, atretik folikül (20X).



Çizim 4.24. PKOS+Resveratrol grubuna ait MT mikrografları. A, sekonder folikül (20X). B, çeşitli evrelerdeki foliküller (10X). CL, korpus luteum; PF, primer folikül; SF, sekonder folikül; TF, tersiyer folikül. Oklar (→), primordiyal folikül.



Çizim 4.25. PKOS+Metformin grubuna ait MT mikrografları. A, folikülogenezin çeşitli evresindeki foliküller (10X). B, tersiyer folikül (20X)



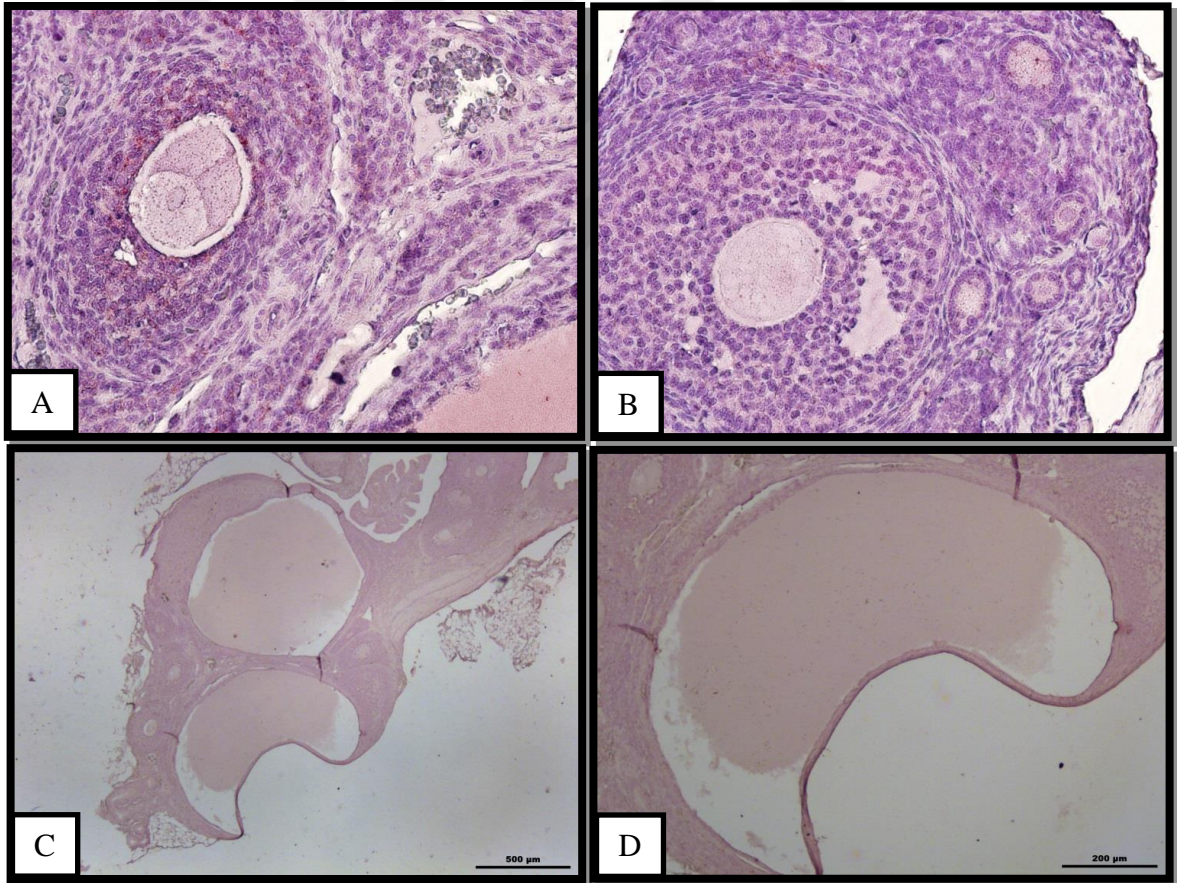
Çizim 4.26. PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait MT mikrografları. A, genel görünüm (4X). B, sekonder folikül (20X). C, sekonder folikül (40X).

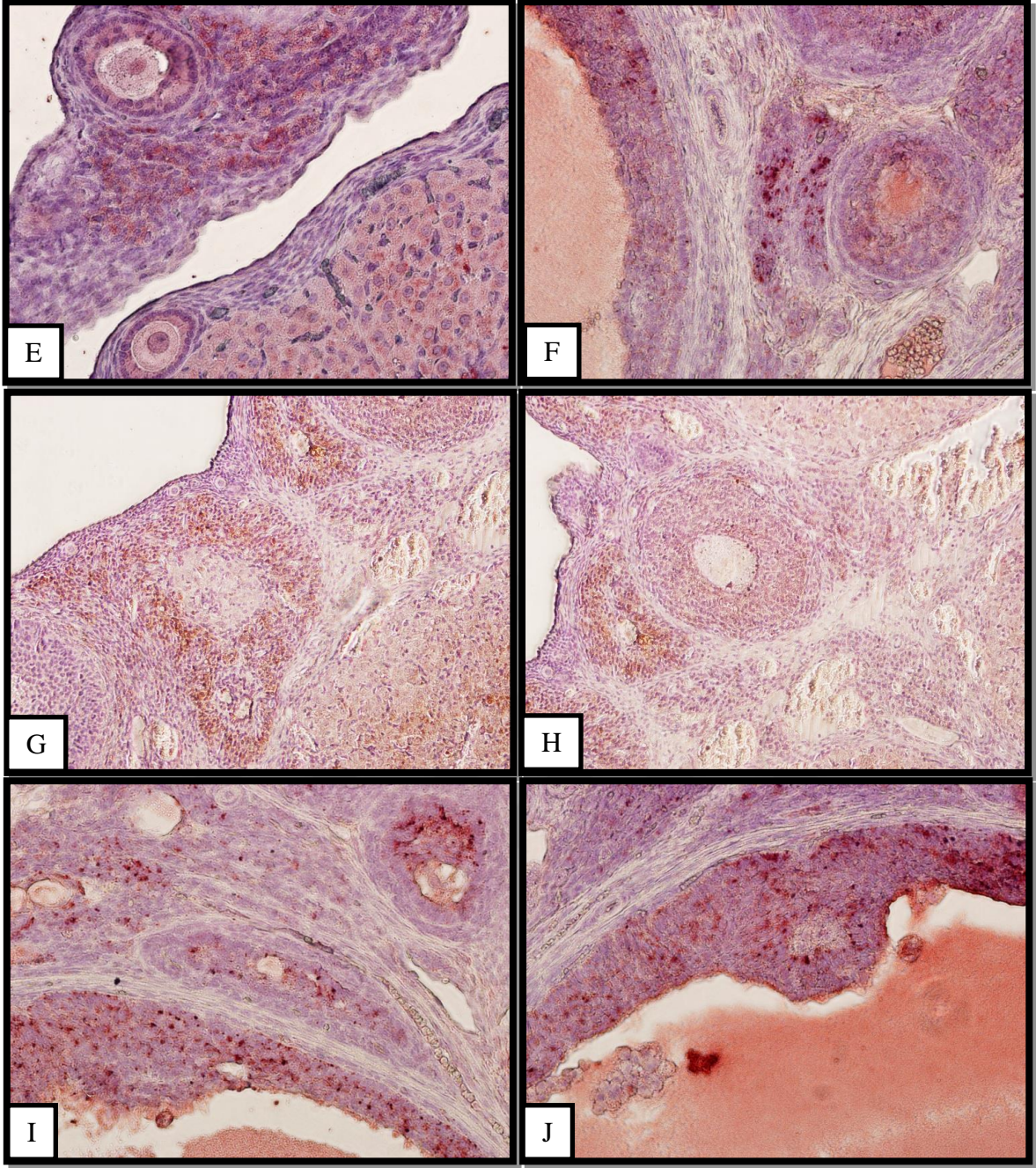
4.5.3. İmmünohistokimya Bulguları

4.5.3.1. SIRT1 İşaretleme

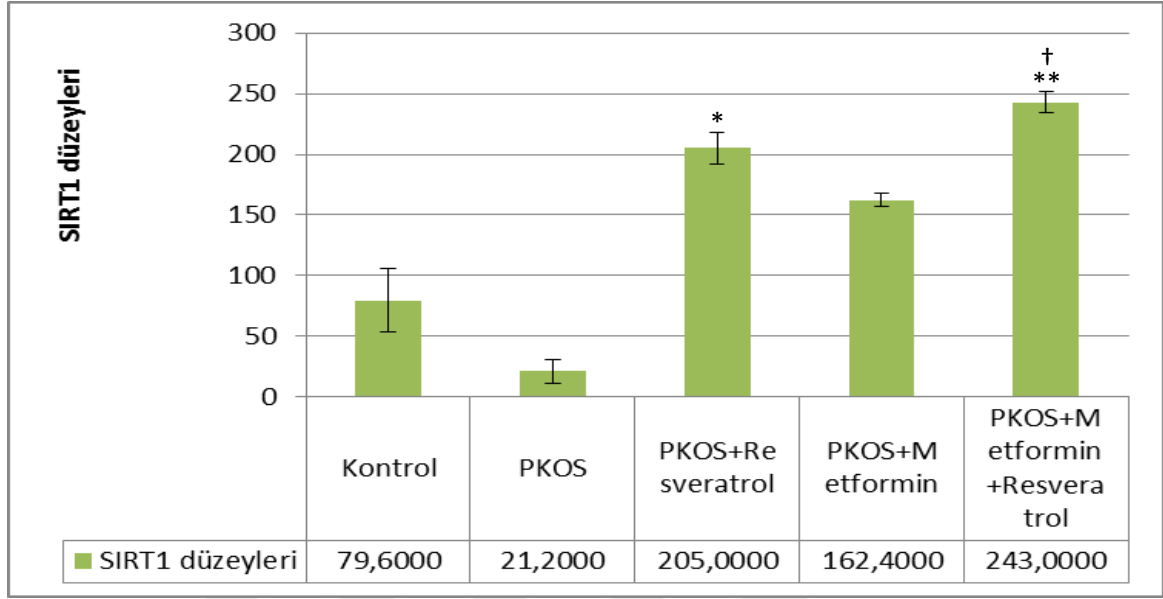
Kontrol ve deney gruplarına ait tüm hayvanların ovaryumlarındaki SIRT1 immünoreaktivitesi incelendi (Çizim 4.27). Tüm foliküllerin granüloza ve teka hücrelerinin nukleuslarındaki immünohistokimyasal SIRT1 boyanma şiddeti ve yaygınlığı semikantitatif H-skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Çizim 4.28).

PKOS+Resveratrol ve PKOS+Metformin+Resveratrol grubunda bulunan foliküllerde SIRT1 immünoreaktivitesi PKOS grubuna kıyasla anlamlı artış göstermiştir (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$). PKOS+Metformin+Resveratrol grubu kontrol grubu ile de anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Tedavi grupları kendi aralarında SIRT1 ekspresyonu açısından anlamlı farklılık göstermemiştir.





Çizim 4.27.Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS + Metformin +Resveratrol gruplarına ait SIRT1 işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A-B, kontrol grubu; C-D, PKOS grubu (4X); E-F, PKOS+Resveratrol grubu; G-H, PKOS+Metformin grubu; I-J, PKOS+Metformin+Resveratrol grubu.

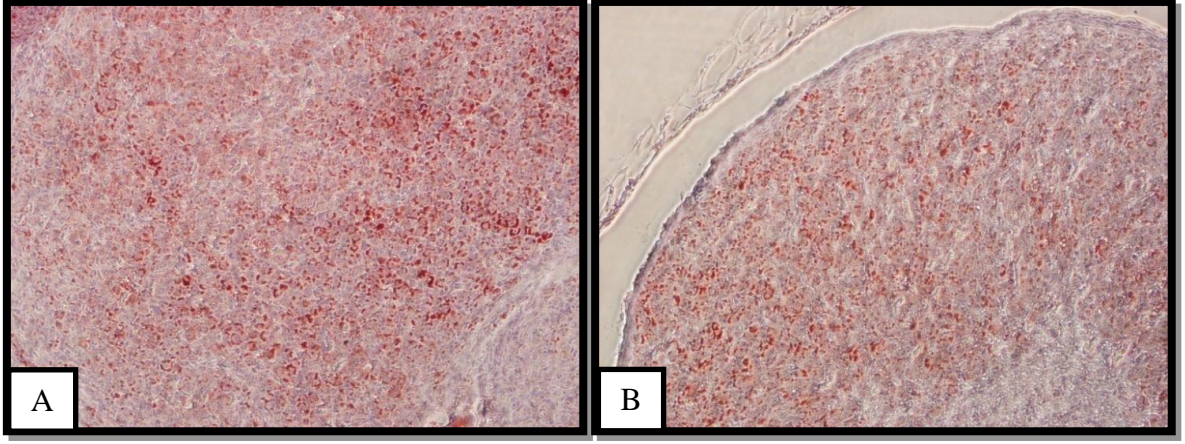


Çizim 4.28. Kontrol, PKOS, PKOS+Salin, PKOS+Etanol, PKOS+Resveratrol, PKOS + Metformin, PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerin SIRT1 immünreaktivitesine ait H-skor ortalama değerleri. **p<0.001, *p<0.05; PKOS grubuyla kıyaslandığında †p<0.05; kontrol grubuyla kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.

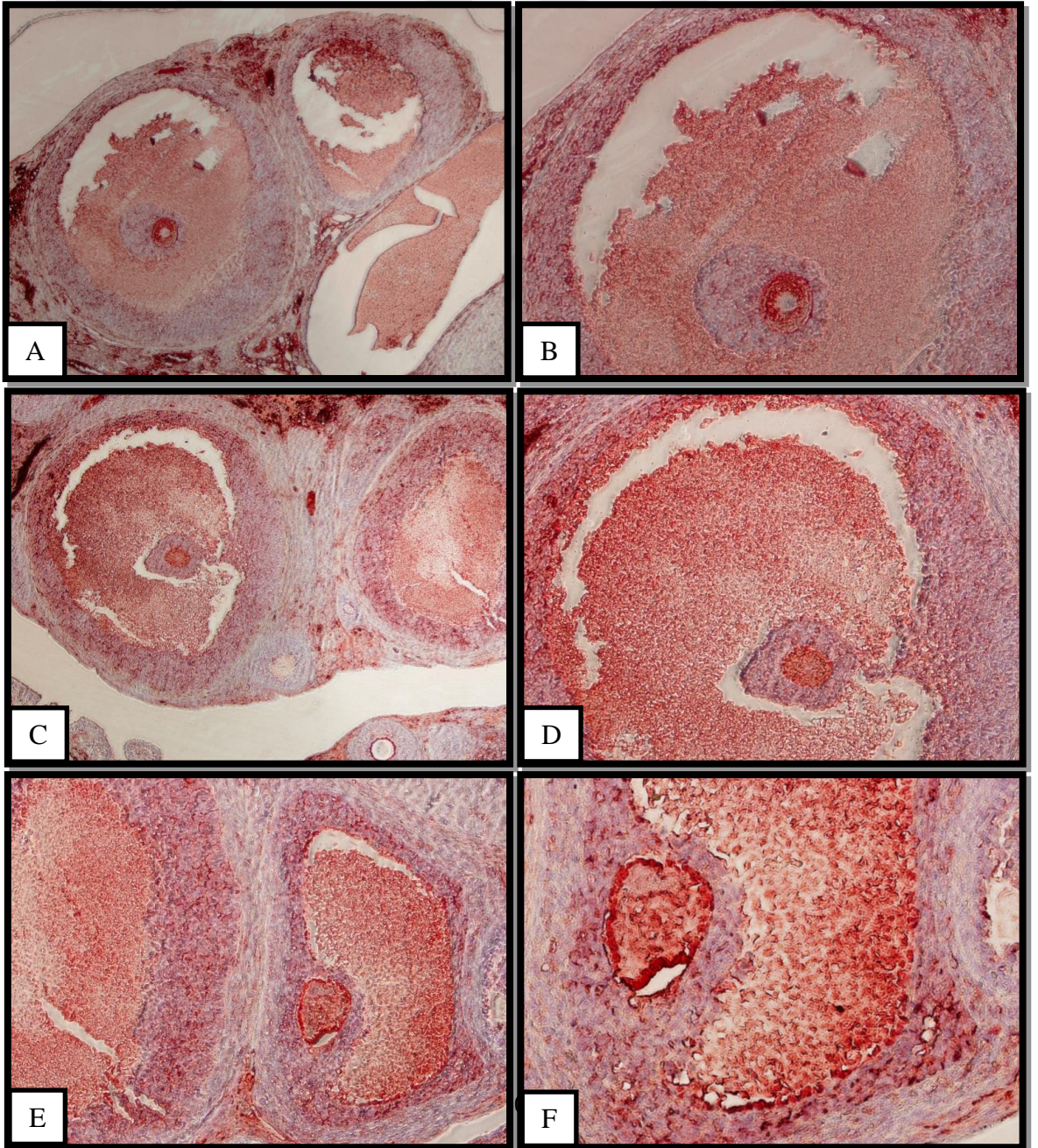
4.5.3.2. AMPK İşaretleme

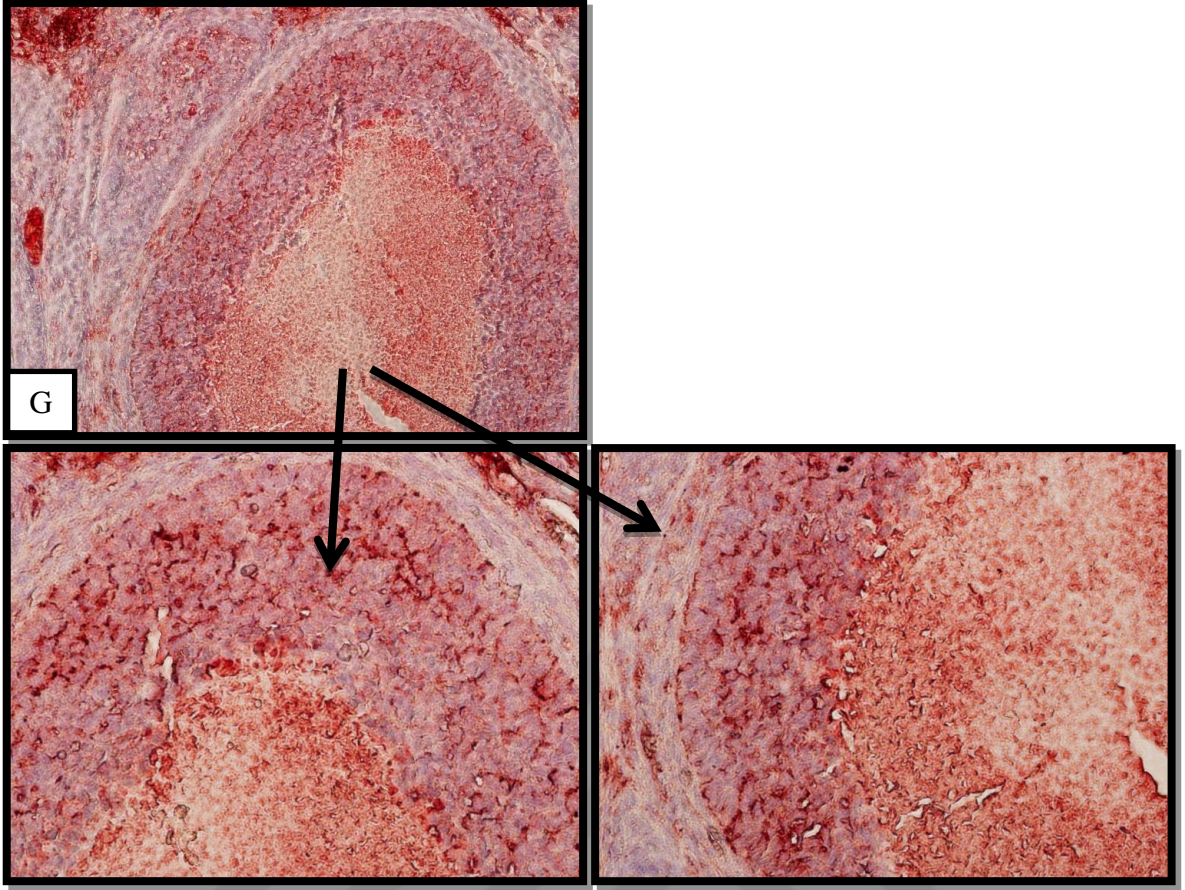
Kontrol ve deney gruplarına ait hayvanların ovaryumlarındaki foliküllerde AMPK immünreaktivitesi incelendi (Çizim 4.29a, 4.29b). Tüm foliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde AMPK immünreaktivitesi boyanma şiddeti ve yaygınlık şeklinde semikantitatif H-skor yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Çizim 4.30).

PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait ovaryum foliküllerinde AMPK immünreaktivitesi PKOS grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (p<0,05). Tedavi grupları kendi arasında ve kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. AMPK immünreaktivitesi en fazla tersiyer foliküllerde gözlemlenmiştir.

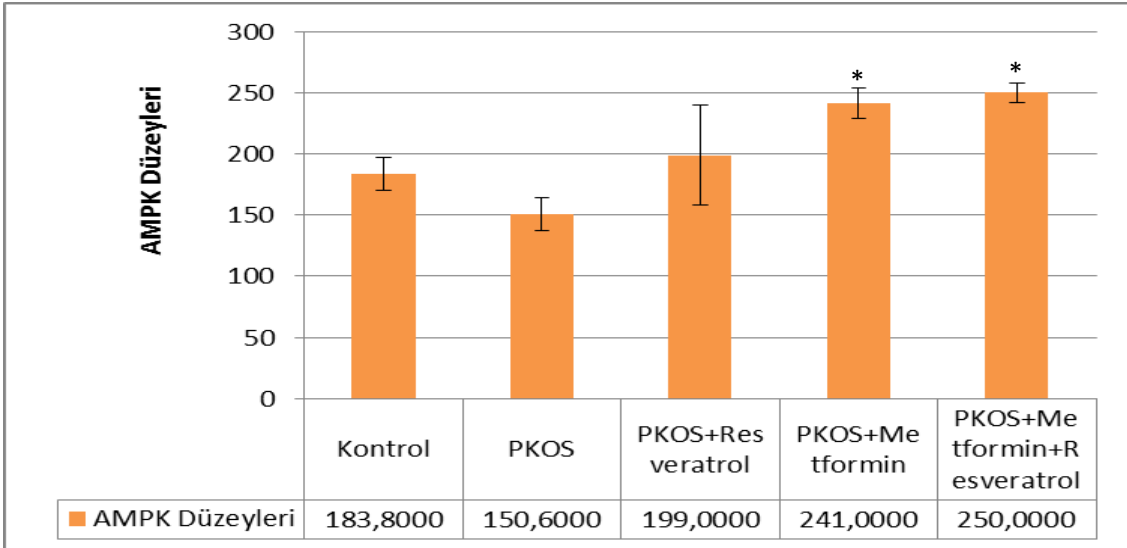


Çizim 4.29a.Kontrol grubuna ait AMPK işaretlemesini gösteren ışık mikrografları.





Çizim 4.29b. PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait AMPK işaretlemeini gösteren ışık mikrografları. A-B, PKOS grubu; C-D, PKOS+Resveratrol grubu; E-F, PKOS+Metformin grubu; G, PKOS+Metformin+Resveratrol grubu.



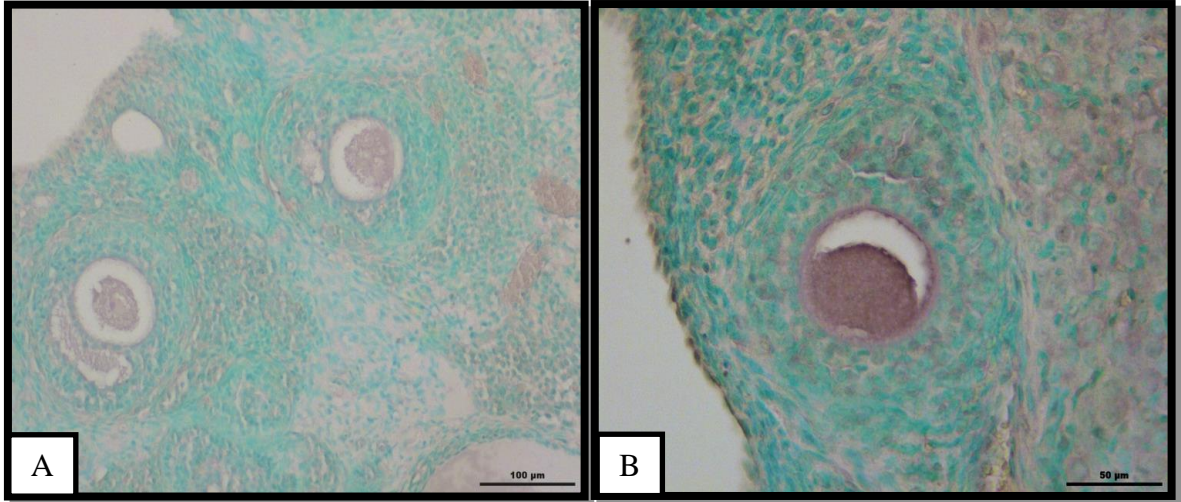
Çizim 4.30. Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS + Metformin +Resveratrol gruplarına ait foliküllerin AMPK immünreaktivitesine ait H-Skor ortalama değerleri. * $p < 0.05$; PKOS grubuyla kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.

4.5.3.3. TUNEL İşaretleme ile Apoptotik Hücre Tayini

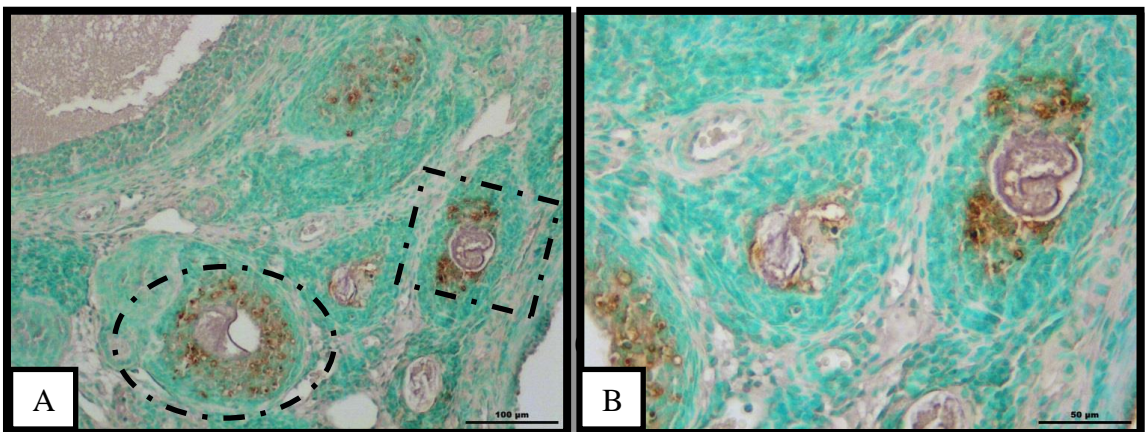
Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum foliküllerinde granüloza ve teka hücre tabakasındaki apoptotik hücreler TUNEL işaretleme yönünden her grupta ayrı ayrı değerlendirildi (Çizim 4.31, 4.32, 4.33) ve apoptotik indeks değerleri hesaplandı (Çizim 4.34).

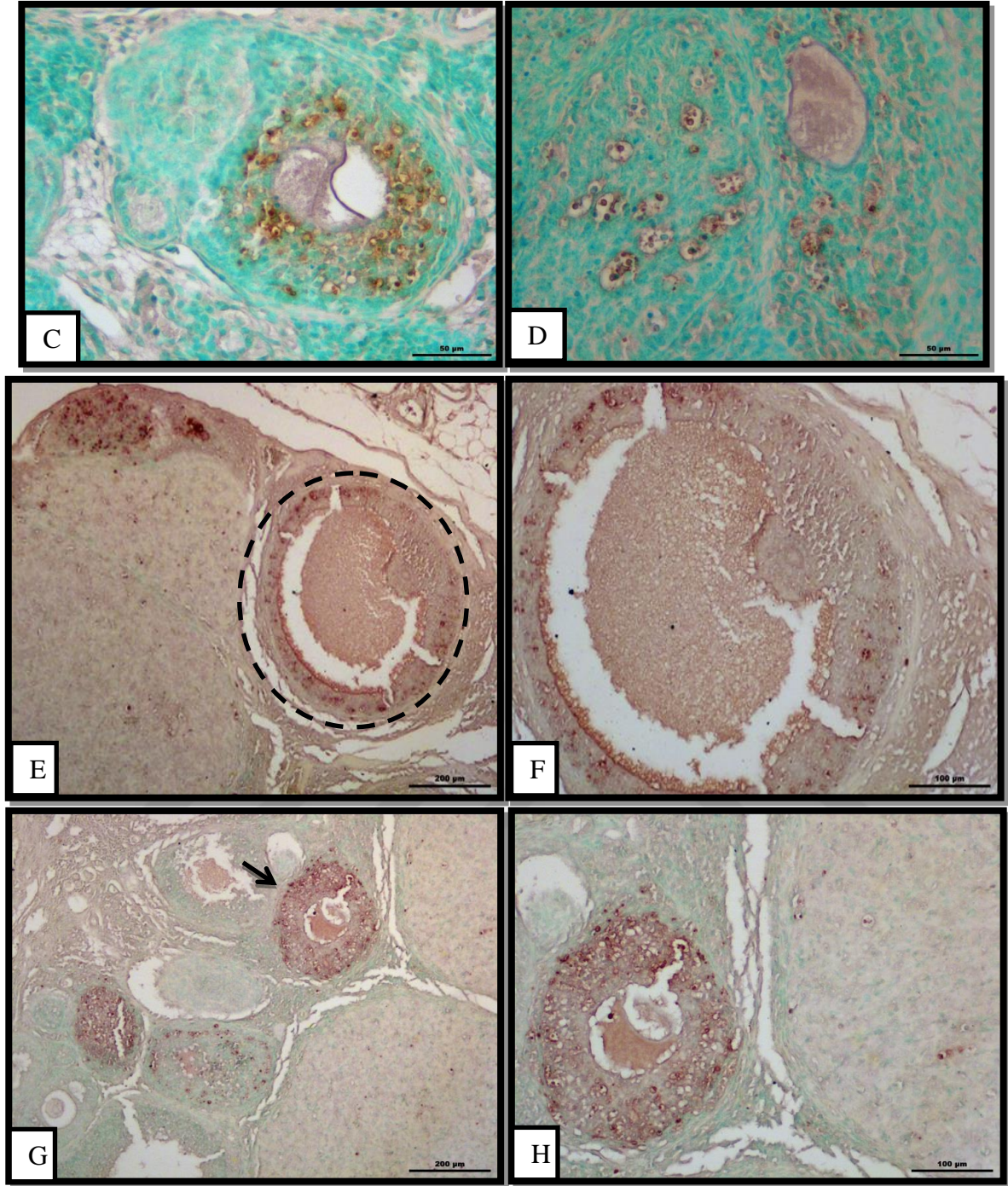
PKOS grubundaki foliküllerin granüloza hücrelerinde apoptotik indeks değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı görüldü ($p < 0,05$). PKOS indüklü apoptozun en fazla Graaf foliküllerinin granüloza hücrelerinde görülmesi dikkati çekti. PKOS grubuna kıyasla PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerin granüloza hücrelerinde görülen TUNEL işaretlemeindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$).

PKOS grubundaki foliküllerin teka hücrelerinde görülen TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p < 0,05$). Tedavi grupları bu hücrelerin sayısını azaltmıştır ancak anlamlı bir fark yaratmamıştır. Tedavi grupları kendi aralarında ve kontrol grubuyla anlamlı bir fark göstermemiştir.

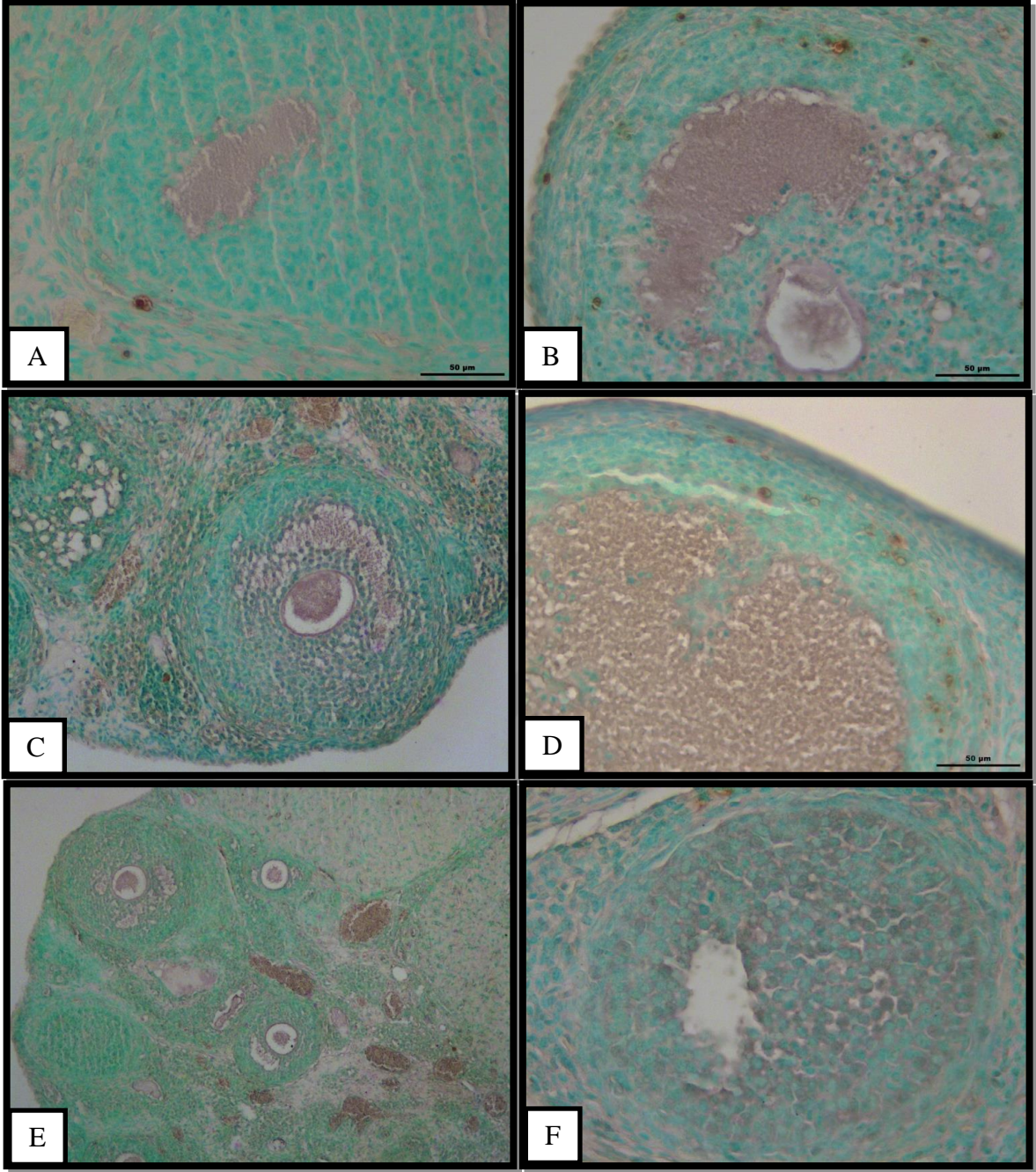


Çizim 4.31. Kontrol gruplarına ait TUNEL işaretleme gösteren ışık mikrografları. A (20X), B, (40X).

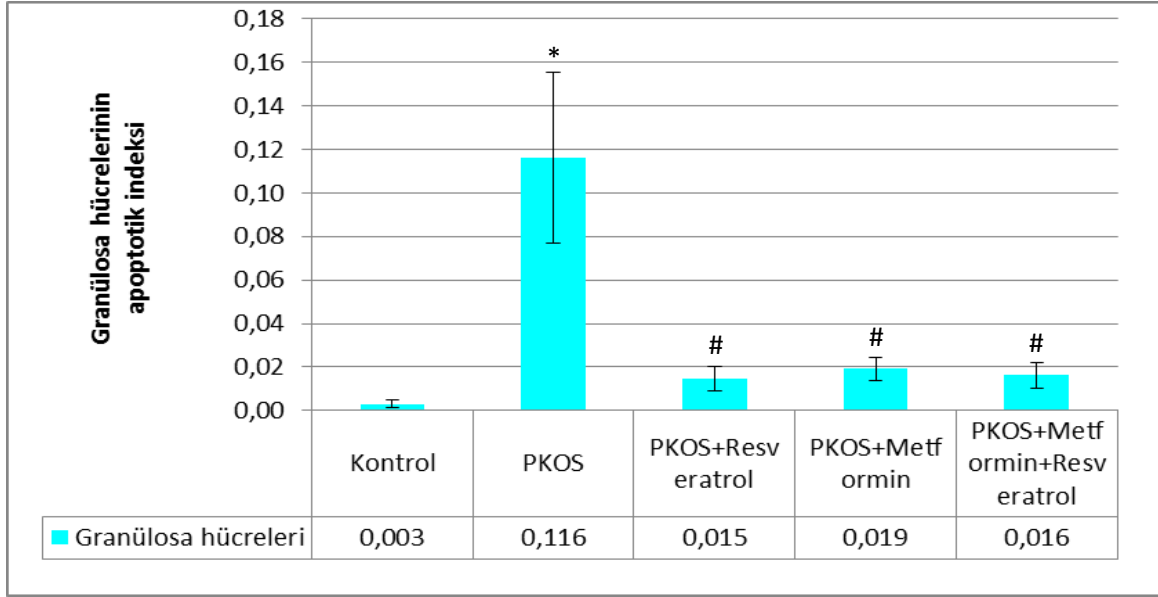




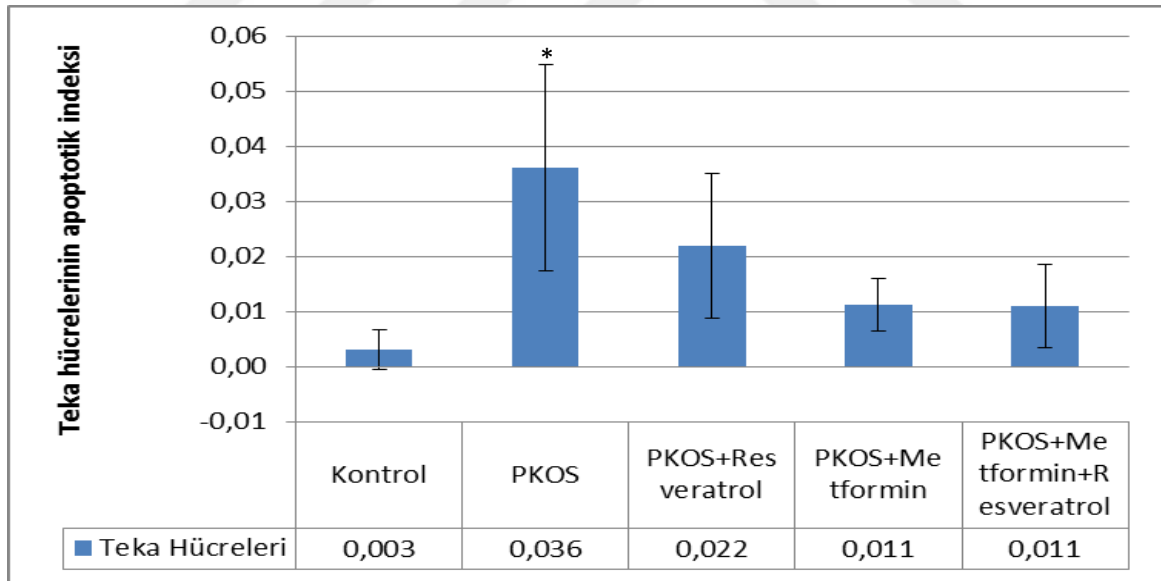
Çizim 4.32. PKOS, PKOS+Salin, PKOS+Etanol gruplarına ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrogramları. A-D, PKOS grubu; E-F, PKOS+Salin grubu; G-H, PKOS+Etanol grubu. B ve C, A'da yuvarlak ve kare içerisine alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü. D, TUNEL(+) hücre içeren apoptotik folikül. F, E'de yuvarlak içerisine alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü, TUNEL(+) tersiyer folikül. G-H, apoptotik hücreler içeren atretik foliküller (→). A,F,H (20X), B-D(40X), E,G (10X).



Çizim 4.33. PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin, PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait TUNEL işaretlemesini gösteren ışık mikrografları. A-B, PKOS+Resveratrol; C-D, PKOS+Metformin; E-F, PKOS+Metformin+Resveratrol. A,B,D (40X).



Çizim 4.34.a. Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol gruplarına ait foliküllerdeki granuloza hücrelerinin TUNEL işaretlemesi ile elde edilen apoptotik indekslerin ortalama değerleri.* $p < 0.05$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. # $p < 0.001$; PKOS grubuyla kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.



Çizim 4.34.b. Kontrol, PKOS, PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS + Metformin +Resveratrol gruplarına ait foliküllerdeki teka hücrelerinin TUNEL işaretlemesi ile elde edilen apoptotik indekslerin ortalama değerleri.* $p < 0.05$; kontrol grubuyla kıyaslandığında. Gruplardaki değerler median (25-75 percentile) olarak ifade edildi.

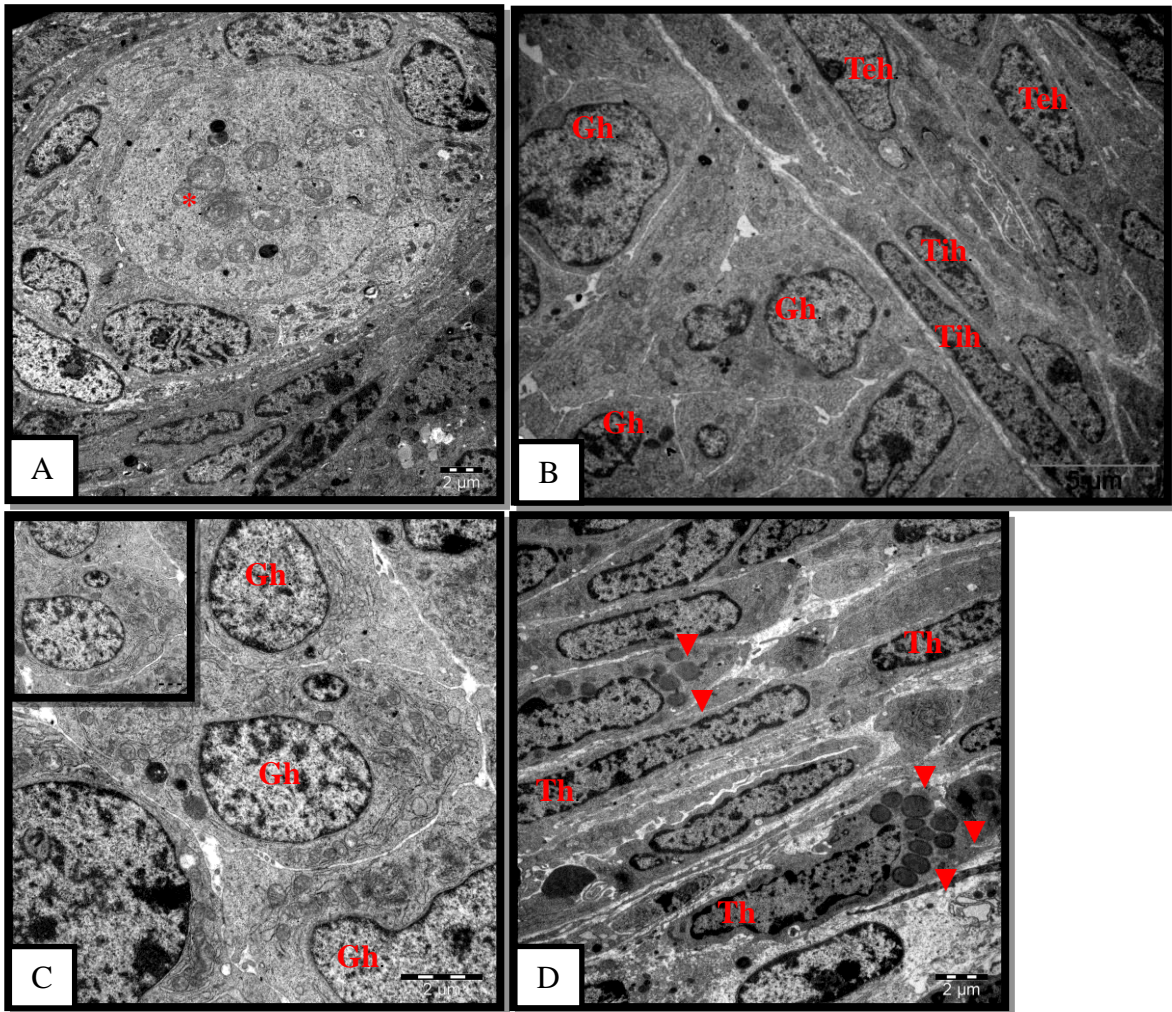
4.6. TEM ile Ultrastrüktürel İnceleme

Kontrol grubuna ait foliküllerin granüloza hücrelerinde belirgin nükleolus içeren ökromatik nükleuslar izlendi. Bu hücrelerin sitoplazmasında belirgin gER ve serbest halde bulunan bol miktarda ribozom gözlemlendi. Ayrıca düzgün membran yapısına sahip raf şeklinde kristal mitokondriyonlar izlendi. Komşu granüloza hücreleri arasında hücre sel bağlantı ve uzantılar dikkati çekti. Folikül hücrelerinin plazma membranları ile folikül hücreleri ve teka tabakası arasındaki bazal membranın düzenli seyrettiği ve düzgün bir yapıda olduğu gözlemlendi. Teka hücreleri bol miktarda düz ER, tübüler kristal mitokondriyonlar ve yüksek oranda lipid damlacığı içeriği ile tipik steroid sentezleyen hücre özellikleri gösterdi (Çizim 4.35). Oositlerin ultrastrüktürü incelendiğinde, kontrol grubundaki ovaryumların primordiyal foliküllerine ait oositlerde ökromatik yapıdaki nükleus ve sitoplazmaya dağılmış mitokondriyonlar görüldü (Çizim 4.35-A). Oosit etrafını saran zona pellusida yapısının düzgün olduğu ve komşu foliküler hücrelerle bütünlük oluşturduğu gözlemlendi (Çizim 4.35-A).

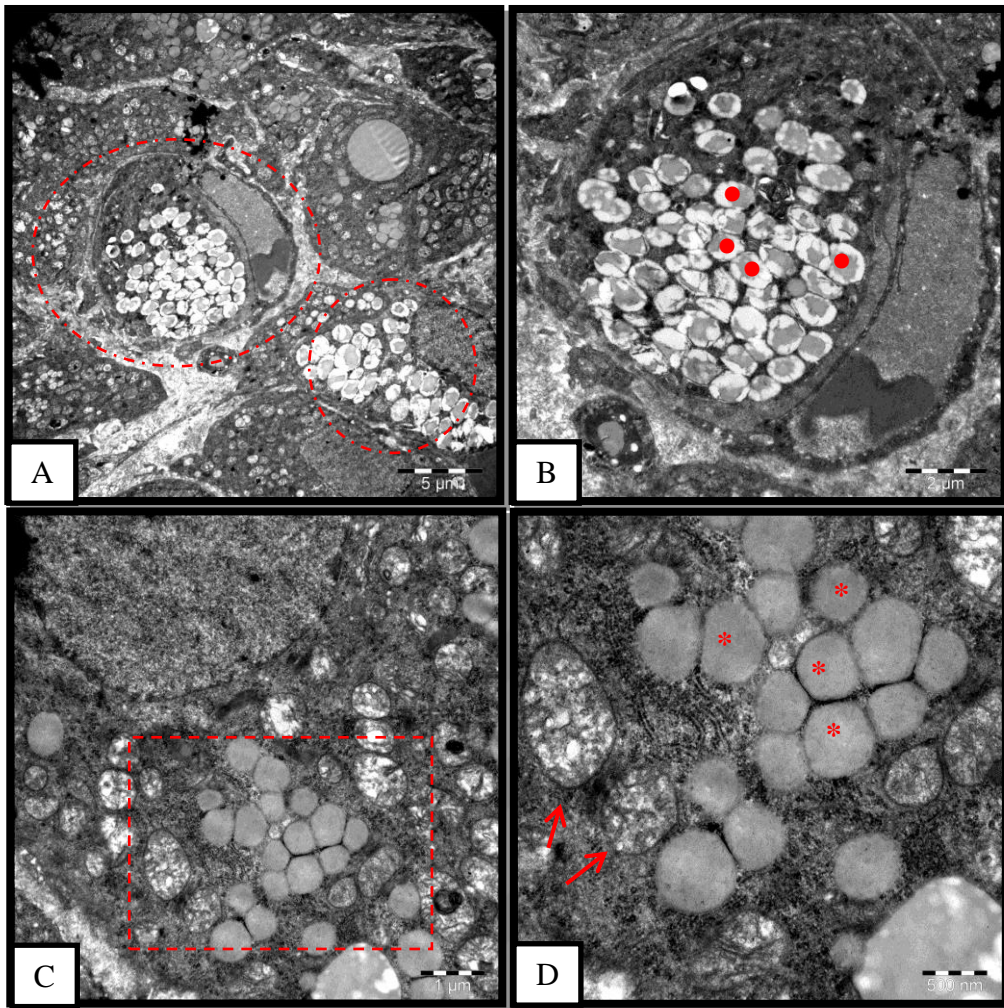
PKOS, PKOS+Salin ve PKOS+Etanol gruplarına ait ileri evre foliküllerdeki granüloza hücrelerinin çoğunun nükleuslarında kromatin materyalinin kondanse olduğu dikkat çekti. Granüloza hücre sitoplazmasında mitokondriyonların şişkin yapıda olması ile birlikte krista yapısında bozukluk ve dejenerasyon gözlemlendi (Çizim 4.36a-C,D,E). Sitoplazmada dejenere mitokondriyonların yanı sıra oldukça fazla miktarda sekonder lizozomların görülmesi (Çizim 4.36a-A,B) ve gER yapısında genişleme (Çizim 4.36a-F) tespit edildi. Diğer gruplara göre PKOS grubunda granüloza hücreleri arasındaki mesafede artış gözlemlendi (Çizim 4.36a-A,F). Ayrıca antruma dökülmüş çok sayıda apoptotik granüloza hücresi dikkat çekti (Çizim 4.37-C). Apoptotik hücrelerde var olan sitoplazmik uzantıların anular (daire sel) şekilli olduğu görüldü (Çizim 4.38-F). Teka hücre tabakasında hücreler arası alanda artış tespit edildi (Çizim 4.36b-A). Ayrıca bu hücrelerde aşırı miktarda lipid birikimi ve krista yapısı bozulmuş dejenere mitokondri (Çizim 4.36b-C,D) ile bol miktarda sekonder lizozom (Çizim 4.37-A) gözlemlendi. PKOS grubunda bazı foliküllerde oositlerin zona pellusida yapısında dejenerasyon ve perivitellin boşlukta genişleme görüldü; bazı oositlerin oolemma yapısında yırtık ve kopmaların varlığı dikkat çekti (4.36c-A,B).

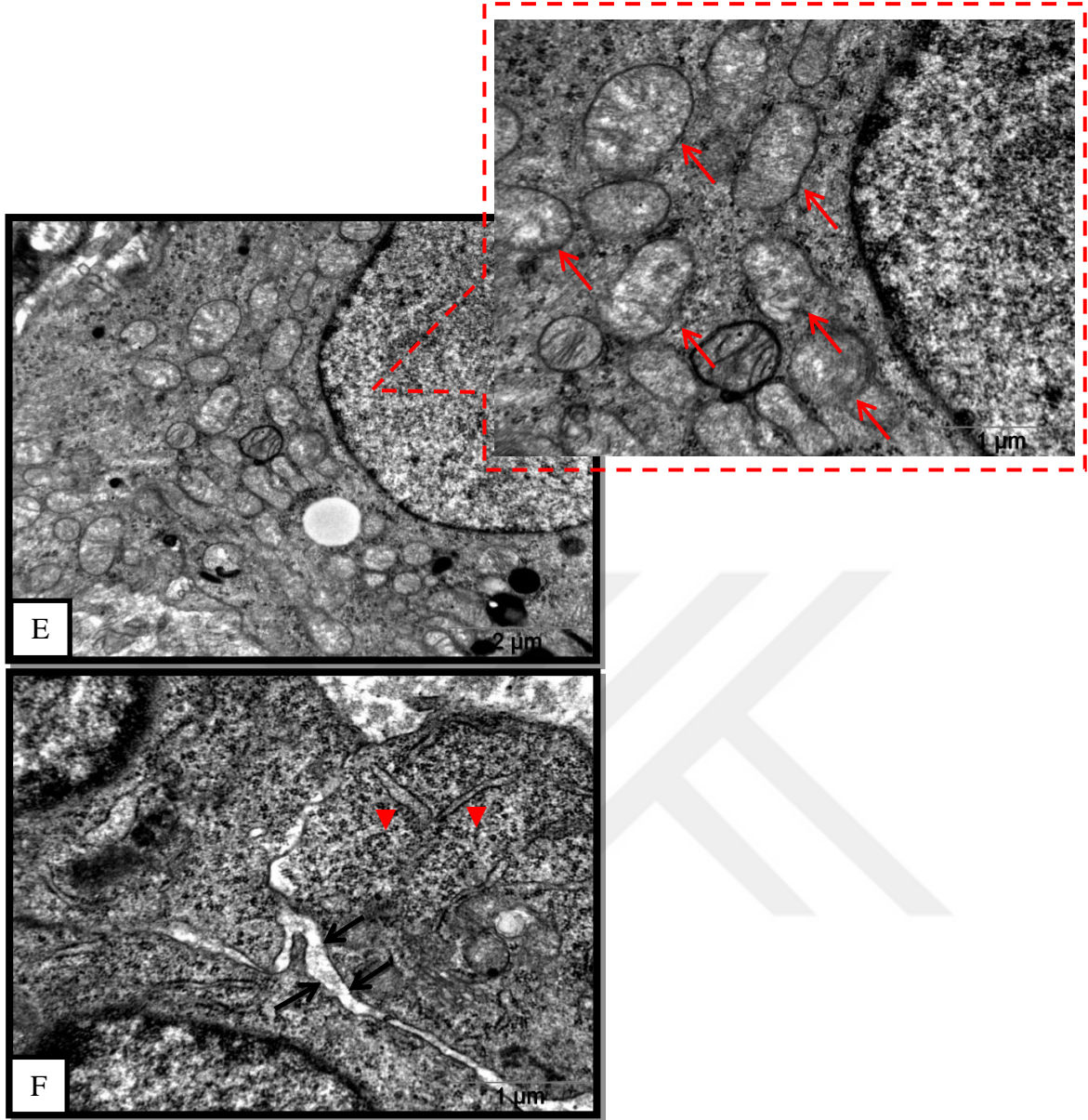
PKOS+Resveratrol, PKOS+Metformin ve PKOS+Metformin+Resveratrol tedavi gruplarındaki foliküllerde apoptotik görünüm lü granüloza hücrelerinin PKOS grubuna göre daha seyrek olduğu ve granüloza hücreleri arasında daha az apoptotik cisim bulunduğu gözlemlendi (Çizim 4.39-A). Granüloza hücre sitoplazmasında her ne kadar

mitokondriyon dejenerasyonları, sekonder lizozomlar ve lipit damlacıkları görülse de sayılarının PKOS grubuna göre daha az olması ve mitokondriyonların kristallarının miktarındaki artış dikkati çekti (Çizim 4.39-B, 4.40). Ayrıca gER yapısının normale döndüğü tespit edildi (Çizim 4.40-B). Teka hücre tabakasındaki hücrelerde düzenli bir yapılaşma ve sağlıklı mitokondri yapısı gözlemlendi (Çizim 4.40-B,D). Tedavi gruplarına ait oositler ultrastrüktürel olarak incelendiğinde düzgün bir zona pellusida yapısı ve çevreleyen granüloza hücreleriyle arasında bütünlük tespit edildi (Çizim 4.39-E,F; Çizim 4.40-E,F; Çizim 4.41-D).

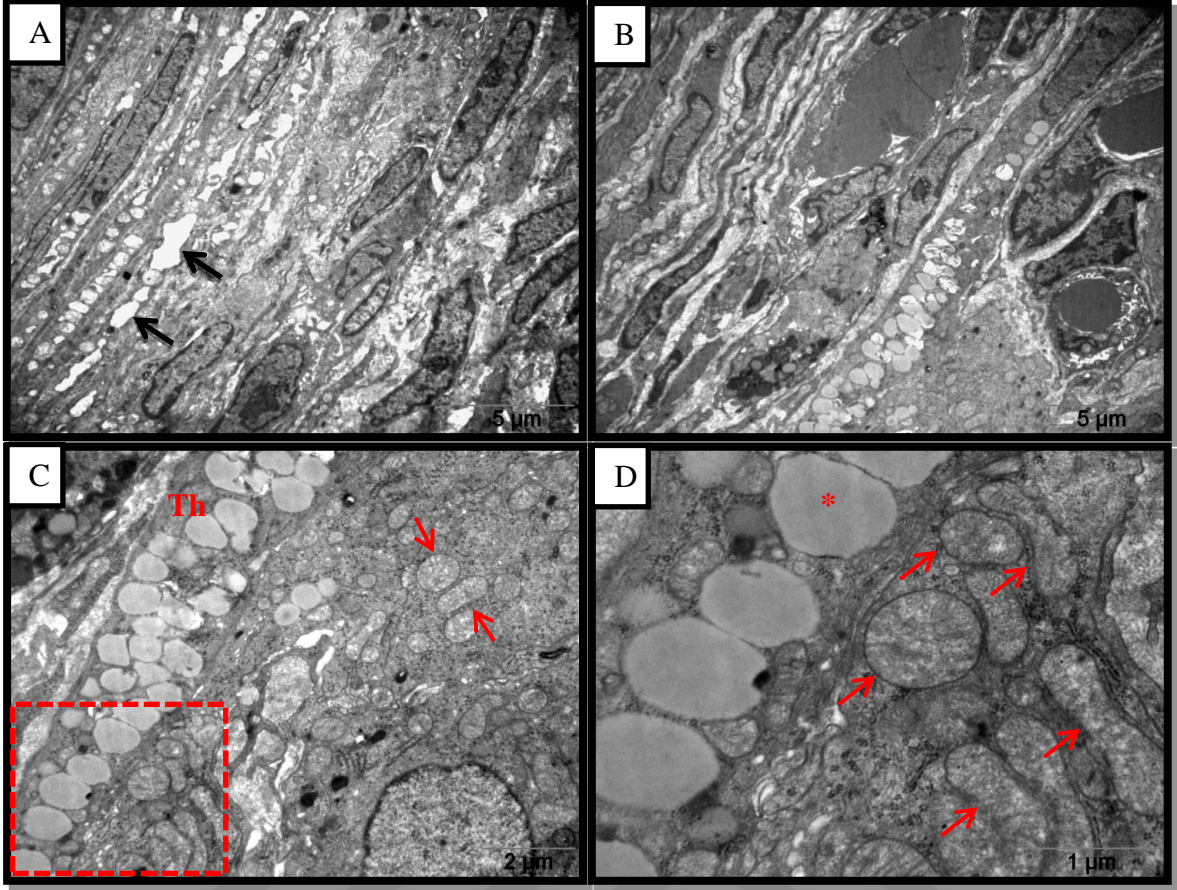


Çizim 4.35. Kontrol grubuna ait elektron mikrograflar. A, primer folikül (6000X). B, granüloza ve teka hücre tabakalarının genel görünümü (5000X). C, granüloza hücre tabakası (12000X). D, teka hücre tabakası ve okbaşı (▲) ile gösterilen lipit damlacıkları (7500X). Gh, granüloza hücresi; Tih, teka interna hücresi; Teh, teka eksterna hücresi. *, oosit.

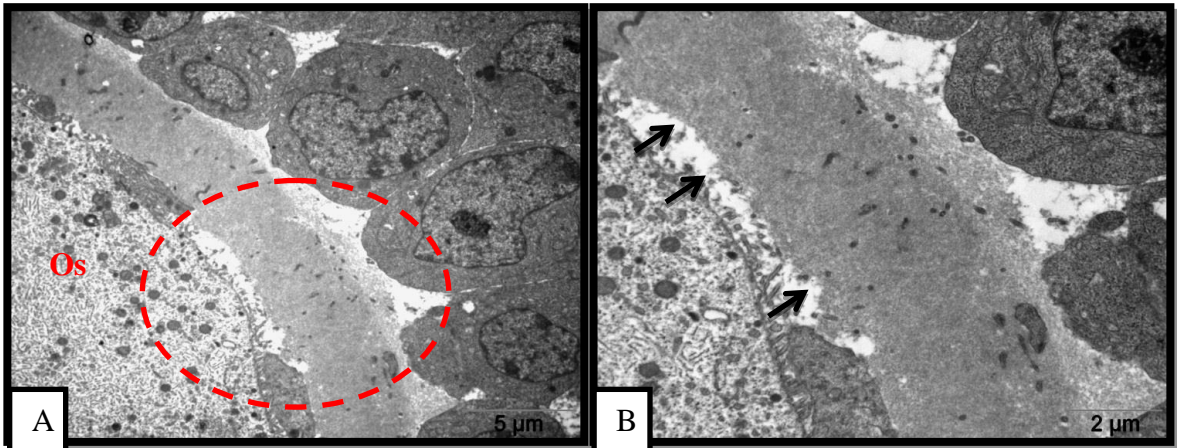




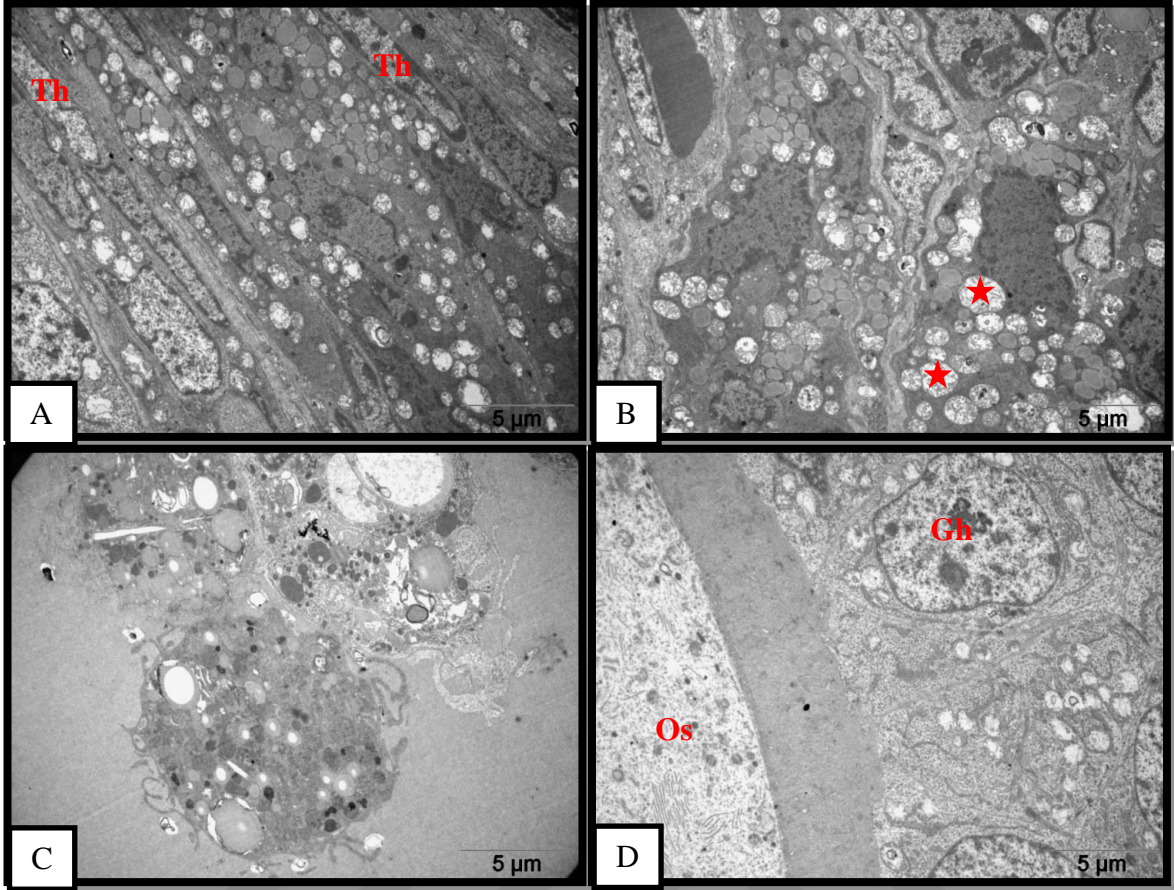
Çizim 4.36a.PKOS grubu granüloza hücrelerine ait elektron mikrograflar. A, granüloza hücreleri arasındaki alanda artış ve çok sayıda sekonder lizozom (•) içeren apoptotik granüloza hücreleri (5000X). B, A'da yuvarlak içerisinde alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü; apoptotik granüloza hücresi (12000X). C, granüloza hücrelerinde dejenere mitokondri ve aşırı lipid damlacığı birikimi (20000X). D, C'de dikdörtgen içerisinde alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü (40000X). (→), krista yapısı bozulmuş, şişmiş, dejenere mitokondriye; * ise aşırı lipid damlacığı birikimine işaret etmektedir.E, granüloza hücresinde çok sayıda dejenere mitokondri (15000X). F, hücreler arası alanda artış (→) ve genişlemiş endoplazmik retikulum (▲) görülmektedir (30000X).



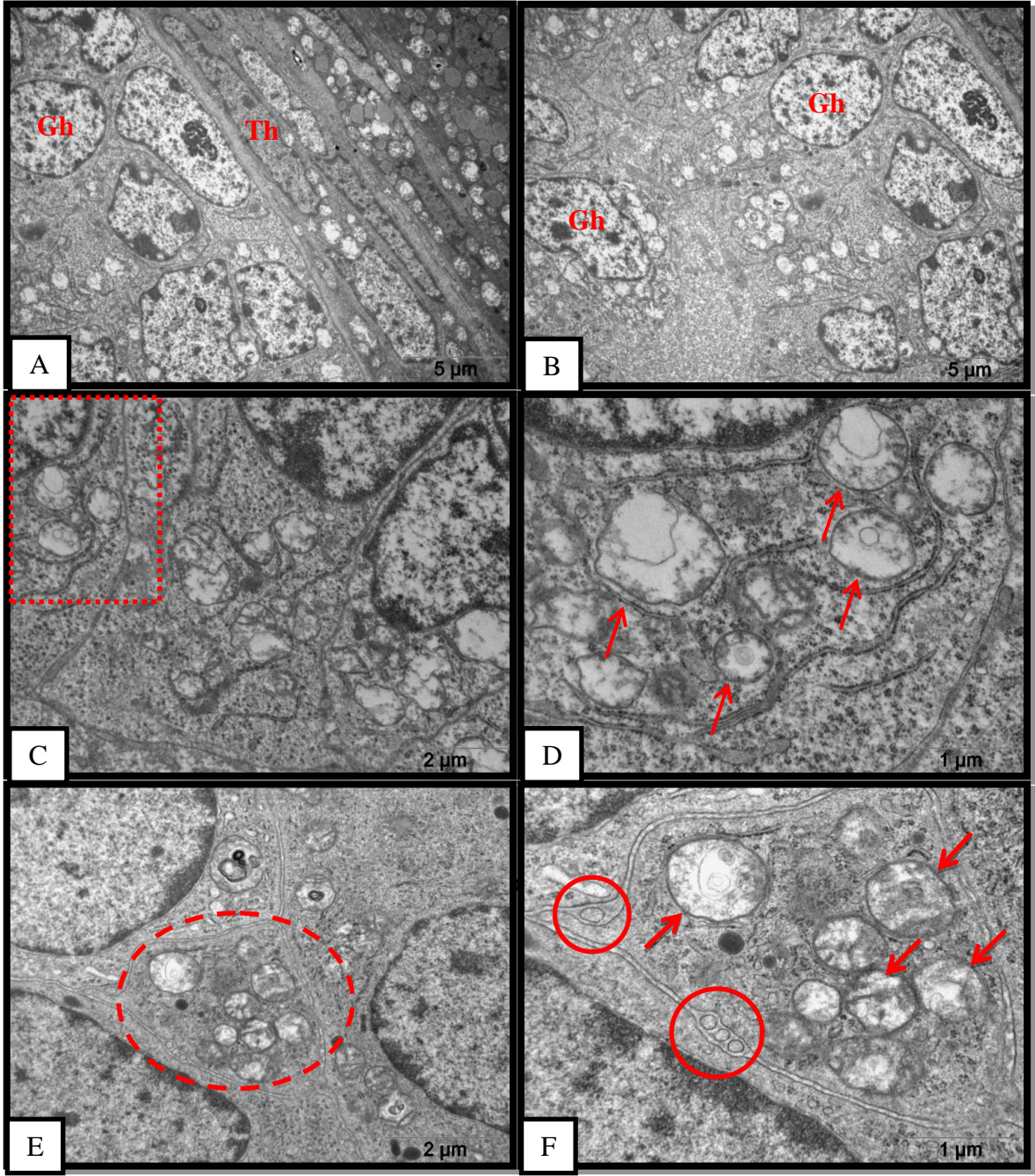
Çizim 4.36b. PKOS grubu teka hücrelerine ait elektron mikrograflar. A, teka hücre tabakasına ait genel görünüm (5000X). Teka hücre tabakasında kontrole göre artan bir kalınlaşma gözlemlenmektedir. Siyah ok (→), teka hücreleri arasındaki alanda artışa işaret etmektedir. B, teka hücre tabakası (5000X). C, teka hücrelerinde aşırı lipid birikimi (*) ve dejenere mitokondri (→) gözlemlenmektedir (10000X). D, C’de dikdörtgen içine alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü (30000X).



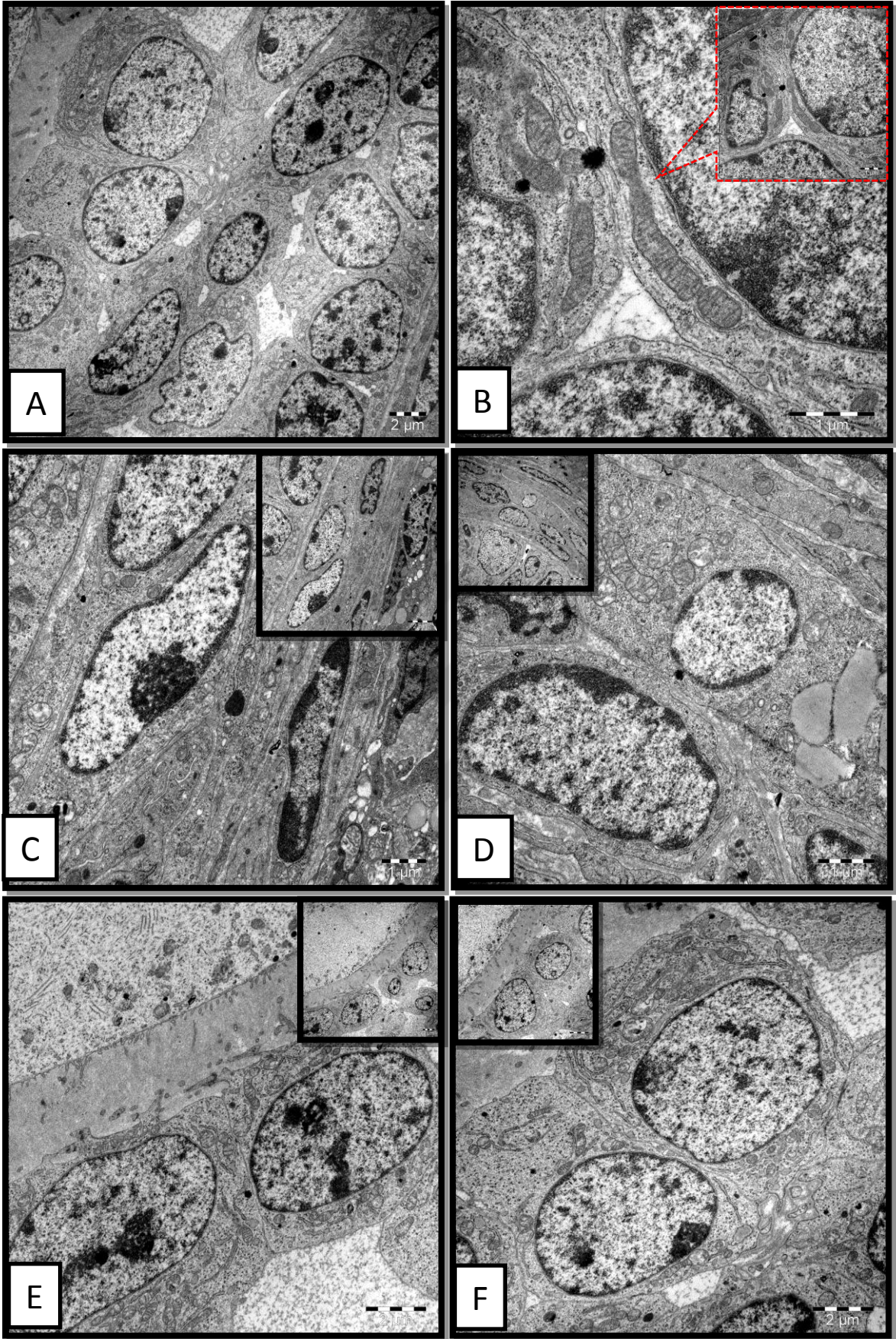
Çizim 4.36c. PKOS grubu oosite ait elektron mikrograflar. A, oositi çevreleyen zona pellusida ile granuloza hücreleri görülmektedir (5000X). B, A’da yuvarlak içerisine alınmış alanın büyük büyütmedeki görüntüsü (10000X). Oklar (→), oosit-zona pellusida-granuloza hücreleri arasındaki kopmaya işaret etmektedir. Os, oosit.



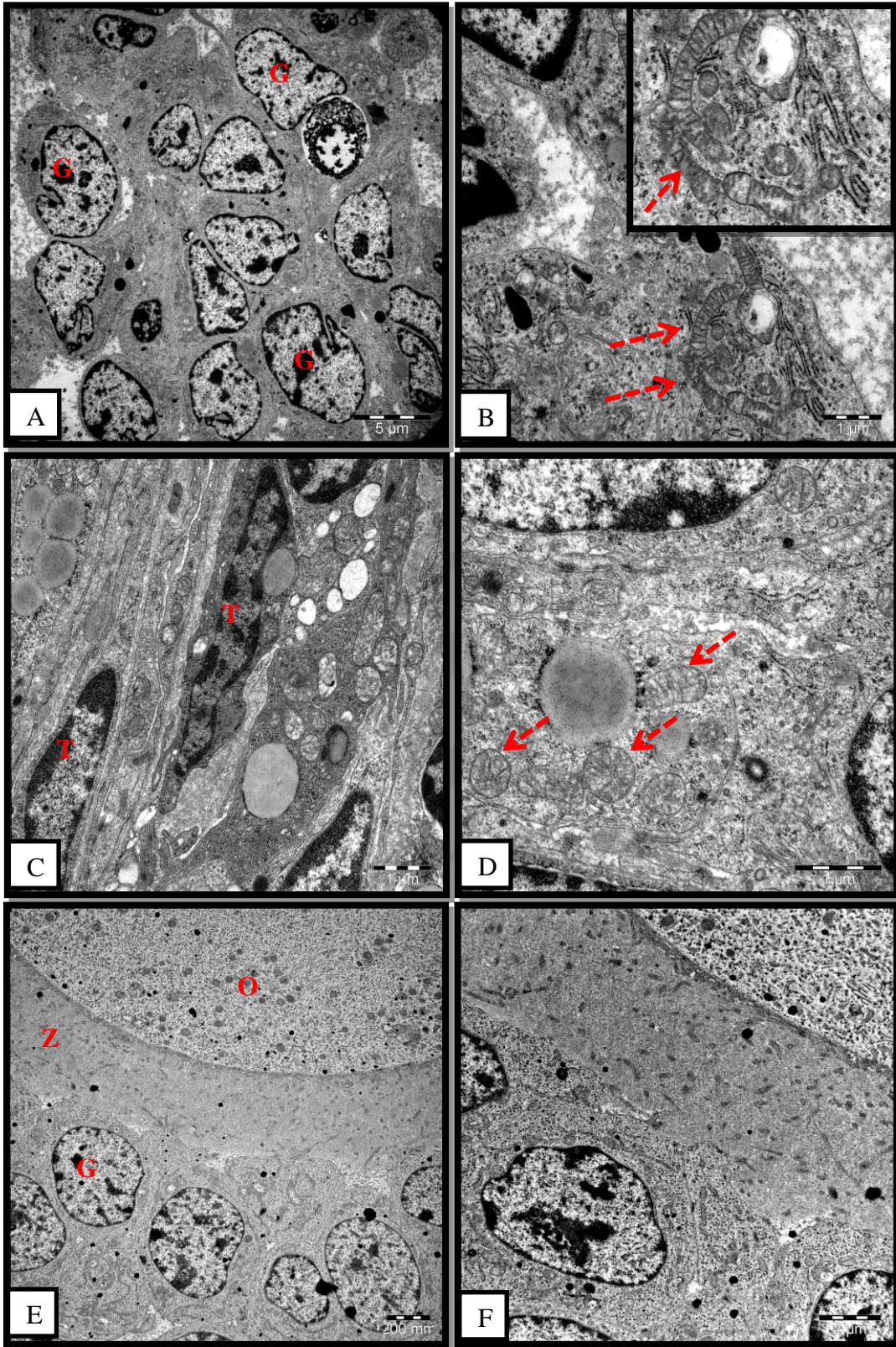
Çizim 4.37. PKOS+Salin grubuna ait elektron mikrograflar. A, teka hücre tabakasının genel görünümü (5000X). B, çok sayıda sekonder lizozom (★) içeren teka hücresi (5000X). C, antruma dökülmüş apoptotik granüloza hücresi (5000X). D, oosit ve etrafında bol miktarda sekonder lizozom içeren granüloza hücresi (5000X). Gh, granüloza hücresi; Os, oosit.



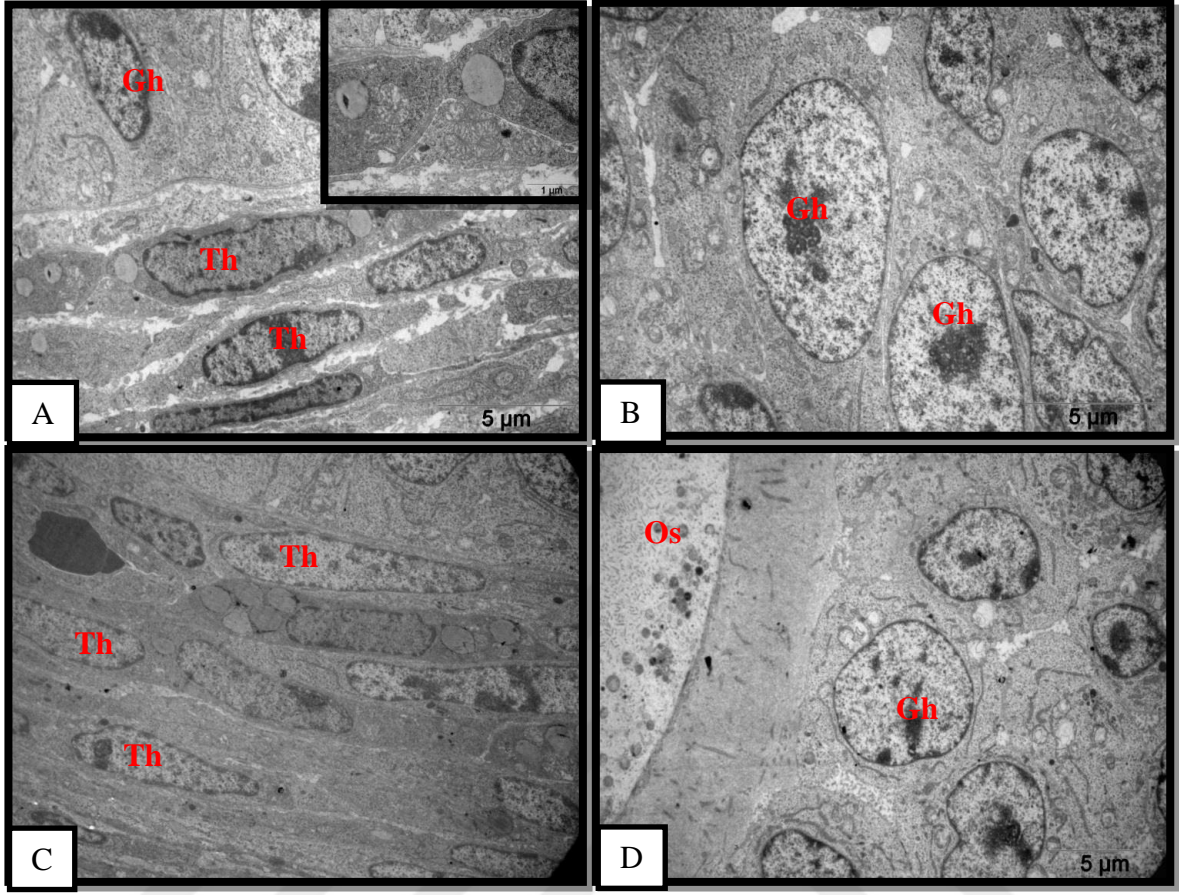
Çizim 4.38. PKOS+Etanol grubuna ait elektron mikrograflar. A, granüloza ve teka hücre tabakalarının genel görünümü (5000X). B, granüloza hücreleri (5000X). C, teka hücreleri (15000X). D, C’de dikdörtgen içerisine alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü (30000X). Oklar (→), krista yapısı bozulmuş ve şişmiş mitokondriye işaret etmektedir. E, granüloza hücreleri arasındaki sitoplazmik bağlantılar ile dejenere mitokondri görülmektedir (15000X). F, E’de kesintili yuvarlak içerisine alınan alanın büyük büyütmedeki görüntüsü (30000X). Yuvarlak içine alınan bölgelerde (○), annular yapıdaki uzantılar görülmektedir. (→), dejenere mitokondriye işaret etmektedir.



Çizim 4.39. PKOS+Resveratrol grubuna ait elektron mikrograflar. A, granüloza hücre tabakası (6000X).B, granüloza hücrelerinde sağlıklı mitokondri ve krista yapısı (30000X). C, teka hücre tabakası (12000X). D, teka hücrelerinde sağlam mitokondri ve krista yapısı (20000X). E-F, sağlıklı oosit-zona pellusida ve granüloza hücreleri (10000X).



Çizim 4.40. PKOS+Metformin grubuna ait elektron mikrograflar. A, granüloza hücre tabakası genel görünüm (5000X). B, granüloza hücrelerinde kesintili okla (\dashrightarrow) gösterilen sağlıklı mitokondri (30000X). C, teka hücre tabakası genel görünüm (20000X). D, teka hücrelerinde kesintili okla (\dashrightarrow) gösterilen sağlıklı mitokondri (30000X). E, oosit-zona pellusida ve granüloza hücreleri (5000X). F, oosit-zona pellusida ve granüloza hücreleri arasındaki bütünlük görülmekte (10000X). G, granüloza hücresi; T, teka hücresi; O, oosit; Z, zona pellusida.



Çizim 4.41. PKOS+Metformin+Resveratrol grubuna ait elektron mikrograflar. A, granüloza ve teka hücre tabakası (5000X). B, granüloza hücreleri (6000X). C, teka hücreleri (5000X). D, sağlıklı oosit-zona pellusida ve granüloza hücreleri (5000X). Gh, granüloza hücresi; Th, teka hücresi; Os, oosit.

5. TARTIŞMA

PKOS, basit lokal bir rahatsızlıktan çok kronik, sistemik bir hastalık olarak nitelendirilmiştir (Murri ve diğ. 2013). Bu nedenle literatürde tedaviye yönelik çok sayıda klinik ve in vitro çalışma bulunmaktadır. Ancak PKOS'un sistemik bir hastalık olması ve folikül gelişiminde önemli bir etken olan hücre-hücre etkileşimlerinin in vitro ortamda yeteri kadar sağlanamaması konunun aydınlatılmasında yetersiz kalmaktadır ve çıkan sonuçların in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bu gerekçelerden dolayı oluşturulan PKOS modelinde resveratrol ve metforminin potansiyel iyileştirici etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanan bu çalışmada, deneylerin sıçanlar üzerinde in vivo olarak gerçekleştirilmesi tercih edilmiştir. PKOS sendromuna sahip kadınların çoğu semptomlarını pubertede gösterdiği için deney hayvanı olarak 3 haftalık prepubertal sıçan seçilmiştir (Mahesh ve diğ. 1970). Hiperandrojenemi PKOS'un temel patojenezini meydana getirdiğinden dolayı, hayvanlarda oluşturulan PKOS modelleri aşırı androjen uygulamasıyla oluşturulmaktadır (Solano ve diğ. 2011, Masszi ve diğ. 2013). Bu nedenle çalışmamızda, deney hayvanlarında PKOS modeli oluşturmak için bir androjen olan DHEA uygulaması tercih edildi.

Çalışmamızda PKOS'un ovaryumda görülen histopatolojik etkilerine karşı metformin ve resveratrolün potansiyel iyileştirici özelliği biyokimyasal, morfolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak incelenmiştir.

PKOS semptomlarından biri olan anovulasyonu tespit etmek için vajinal smearla sıçanların östrus durumu tayin edilmiştir DHEA uygulanan sıçanların düzenli östrus siklusunu kaybettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Jang ve diğ. 2014). Bizim çalışmamızda da DHEA uygulanan sıçanların düzensiz ve uzamış siklus gösterdiği tespit edilmiştir.

Gruplardaki vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde, PKOS oluşturulmuş deney grubunun ağırlık açısından kontrole göre artış gösterdiği ve Metformin uygulanan tedavi grubunun bu artışı azalttığı ve kontrole yakın değerler aldığı istatistiksel olarak belirlenmiştir. Bu bulgularımız daha önce Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile örtüşmektedir (Sun ve diğ. 2016). Tedavi gruplarından Metformin ve Metformin+Resveratrol grubunda vücut ağırlığı açısından anlamlı azalış görülürken Resveratrol tedavi grubunda görülmemesi, bu etkinin Metformin kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Kyselova ve arkadaşları da farelerde yaptıkları çalışmada resveratrolün vücut ağırlığına etki etmediğini tespit etmiştir (Kyselova ve diğ. 2003). Ovaryum ağırlığı

bulguları ve istatistiksel sonuçlar da vücut ağırlıkları ile paralellik göstermiştir. Resveratrol uygulaması her ne kadar PKOS grubuyla karşılaştırıldığında ovaryum ağırlığını azaltsa da anlamlı bir fark oluşturamamıştır. Ayrıca çalışmada resveratrolün diğer organlar üzerindeki etkisine bakılmadığından dolayı, ovaryum ağırlığını düşürse dahi bu durum tek başına vücut ağırlığını düşürmeye yeterli gelmemiş olabilir.

PKOS'ta bozulan gonadotropin salınımıyla ilişkili olarak FSH ile kıyaslandığında artan LH sekresyonu ve dolayısıyla LH/FSH oranında yükselme gözlemlenmektedir (Ehrmann 2005). Çalışmamızda tedavi gruplarının FSH seviyeleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı tespit edilmiştir. Serum LH seviyesi ise kontrol grubuna kıyasla tedavi almayan PKOS gruplarında anlamlı artış göstermiştir. Tedavi grupları kendi içinde ve kontrol grubuyla anlamlı bir farklılık sergilemezken PKOS grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir. Gruplara ait LH/FSH oranına baktığımızda, tedavi gruplarının PKOS'da gözlemlenen artmış LH/FSH oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular ışığında tedavi gruplarının, özellikle resveratrolün, gonadotropinlerin salınımını etkileyerek ovulasyonu düzene soktuğu söylenebilir. Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da metforminin bu etkisini doğrulamaktadır.

Serum testosteron seviyesine bakıldığında, PKOS grubunda aşırı androjen birikimi olduğu için kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit edilmiştir. Resveratrol grubu haricindeki tedavi grupları serum testosteron seviyesini kontrol grubunun seviyesine düşürememiştir; ancak PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Resveratrol grubunda anlamlı düşüş görülürken Resveratrol+Metformin tedavi grubunda görülmemesi metformin ile resveratrolün androjen seviyesi üzerinde antagonist çalışabileceğini düşündürmüştür. Resveratrolün hiperandrojenizmi düzenlemesi teka hücreleri üzerindeki anti-proliferatif veya pro-apoptotik etkilerinden kaynaklanmış olabilir. Bu hipotezimiz Ortega ve arkadaşlarının in vitro teka-interstisyel hücrelerde yapmış olduğu deneyde resveratrolün, androjen üretimini ve proliferasyonu inhibe etmesiyle paralellik göstermektedir (Ortega ve diğ. 2012). Resveratrolün bu etkiyi teka-interstisyel hücrelerde androjen biyosentez yolağında görevli enzim olan Cyp17a1'in ekspresyonunu inhibe ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bizim bulgularımızdan farklı olarak Sun ve arkadaşları (2013) metforminin serum testosterone seviyesini düşürdüğünü tespit etmiş ve bu sonucu metforminin insulin direncini düşürerek hiperandrojenizmi etkilemiş olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Bulgularımızdaki bu farklılık çalışmalarımızda farklı metformin dozu ve uygulama süresi seçişimizden kaynaklanmış olabilir.

En çok küçük antral foliküllerden salınan ve menstrual siklustan bağımsız en iyi PKOS belirteçlerinden olan AMH (Eilertsen ve diğ. 2012).; PKOS grubunda anlamlı artış göstermiş, tedavi grupları ise bu seviyeyi düşürmüştür. Metforminin PKOS'lu hastalarda AMH seviyesini düşürdüğü ve ovulasyonu düzenlediği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Neagu 2012). Resveratrolün PKOS modelinde AMH üzerindeki iyileştirici etkisi ise ilk defa Ergenoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (Ergenoğlu ve diğ. 2015). Resveratrolün farklı dozunun denendiği bu çalışmamız da ikinci kez bu bulguyu desteklemiştir.

Oksidatif stresin PKOS patojenezinde potansiyel rol oynadığı bilinmektedir (Zuo ve diğ. 2016). Çalışmamızda PKOS gruplarında artan MDA seviyesi lipid peroksidasyon yoluyla oksidatif stresin artmış olduğunu göstermektedir. Tedavi gruplarından Resveratrol ve Resveratrol+Metformin grubunun serum MDA seviyesini PKOS grubuna göre anlamlı oranda düşürmesi, Metformin uygulanan grupta ise bir fark görülmemesi iyileşmenin resveratrolün antioksidan özelliği sayesinde olduğunu düşündürmektedir. Resveratrolün ovaryumda (Banu ve diğ. 2016) ve diğer dokulardaki (Cheserek ve diğ. 2016) antioksidan özelliği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

Oksidatif stres (OS) ile inflamasyon arasında sıkı bir bağlantı olduğu kabul edilmektedir (Zuo ve diğ. 2016) ve PKOS düşük dereceli inflamasyonla ilişkili bulunmuştur (Ortega ve Duleba 2015). Çalışmamızda da PKOS grubuna sıçanlarda doku ve plazma TNF- α seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Üç tedavi grubu da doku ve plazmadaki TNF- α seviyelerini anlamlı derecede azaltmıştır. Resveratrolün ve metforminin diğer dokulardaki antiinflamatuvar etkileri daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Rege ve diğ 2013, Li ve diğ. 2016). Bu çalışmada ise DHEA uygulanmış ovaryum üzerindeki etkileri tespit edilerek antiinflamatuvar özellikleri bir kez daha ispatlanmıştır. Çalışma ayrıca PKOS modeli üzerinde resveratrolün TNF- α seviyesine etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Ovaryum morfolojisi incelendiğinde PKOS grubuna ait sıçanlarda primordiyal folikül sayısının azaldığı ve ovaryum rezervinin düştüğü tespit edilmiştir. Tedavi grupları ise bu azalmayı anlamlı ölçüde azaltmıştır. PKOS grubuna ait sıçanlar herhangi bir tedavi almadığı için hızla primordiyal folikül kaybına uğrarken, tedavi gruplarında bu hızın azalması, resveratrol ve metforminin bu etkiyi primordiyal folikülden primer foliküle geçişi inhibe ederek gerçekleştirmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Primer folikül sayısı incelendiğinde sadece kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Genel olarak PKOS ve tedavi grupları arasında primer

folikül sayısı açısından bir fark görülmemiştir. PKOS'ta primordiyal havuz azalırken primer foliküllerin beklendiği kadar çok olmayışı; folikülogenez sürecindeki bu foliküllerin bir kısmının sekonder foliküle dönüşmüş olması, bir kısmının ise atreziye uğramış olmasından kaynaklanabilir. Bu düşüncemiz PKOS grubunda görülen artmış sekonder ve atretik folikül sayısı ile uyusmaktadır.

Sekonder folikül sayısı incelendiğinde en fazla PKOS grubunda tespit edilmiştir. Bu grupta azalan primordiyal foliküllerin folikülogenezle birlikte sekonder foliküllere dönüşmüş olabileceğini düşünmekteyiz. PKOS grubuna ait doku ve plazmada artan AMH seviyesi de bu bulgularımızı desteklemektedir.

Tersiyer folikül sayısı incelendiğinde tedavi grupları ve kontrol grubu arasında anlamlı fark görülmezken, PKOS grubunda istatistiksel olarak düşüş tespit edilmiştir. Bu bulgu tedavi gruplarının folikülogenezi düzenleyerek normale yakın bir duruma getirdiğini göstermiştir. PKOS grubunda sayısı artan sekonder foliküller tersiyer foliküle dönüşemediği için, tersiyer folikül sayısı kontrole göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır.

Korpus luteum sayısı da tersiyer folikül sayısı ile paralel olarak kontrol ve tedavi gruplarında yaklaşık olarak aynı değerleri alırken PKOS grubunda sayısı oldukça azdır. Bunun nedeni de PKOS'ta folikülogenezin sekonder folikül aşamasında durması ve ovulasyon gerçekleşmediği için korpus luteumun oluşmamasıdır. Bu açıdan bakıldığında tedavi grupları folikülogenezi düzenleyerek ovulasyonun gerçekleşmesini sağlamıştır. Ergenoğlu ve arkadaşlarının (2015) resveratrol ile yaptıkları çalışma da bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.

PKOS'lu sıçanların ovaryumunda bu foliküllerin yanı sıra kontrol ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren çok sayıda kistik ve atretik folikül gözlemlenmiştir. Kistik foliküllerde granüloza hücre tabakası çok azalmıştır ve teka hücrelerinde hiperplazi gözlemlenmiştir. H&E boyalı kesitlerde gözlemlenen atretik foliküller, TUNEL ve elektron mikroskopik bulgularla da desteklenmiştir.

TUNEL işaretlemelerini değerlendirdiğimizde PKOS grubuna ait sıçanlarda folikülogenezin farklı aşamalarındaki foliküllerin TUNEL(+) olduğunu tespit ettik. Tedavi gruplarını incelediğimizde resveratrol grubuna ait foliküllerin teka hücrelerinde apoptoza rastlandığı ancak bunun anlamlı fark oluşturmadığını tespit ettik. Hayvan sayısının arttırıldığı ileriki çalışmaların bu konuya ışık tutacağını düşünmekteyiz. Zira Wong ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada resveratrolün teka hücreleri üzerinde pro-apoptotik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Bu sayede resveratrolün PKOS gibi teka hücre hiperplazisi gösteren hastalıklarda potansiyel tedavi edici etkisi olabilir. Resveratrol

grubuna ait foliküllerde granüloza hücre apoptozuna çok rastlanmaması Maccarone (1999) ve Ortega'nın (2012) 'resveratrol granüloza hücreleri üzerinde anti-apoptotik etki göstermiştir' hipotezi ile uyumaktadır.

Resveratrolün SIRT1 mRNA ekspresyonunu arttırarak deasetilasyon mekanizması üzerinden luteal faz bozukluğunda potansiyel tedavi edici olduğu daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Morita ve diğ. 2012). PKOS ve tedavi gruplarına ait immun boyamalara bakıldığında SIRT1 ve AMPK immünreaktivitesinin PKOS grubunda az, tedavi gruplarında ise fazla olduğu tespit edilmiştir. En fazla ekspresyonun ise kombine tedavi grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum SIRT1 aktivatörü olan resveratrol ile AMPK aktivatörü olan metforminin sinerjik çalışması sonucu meydana gelmiş olabilir. Resveratrolün AMPK'yı indirekt aktive etme yeteneğinin olması (Benrick 2013) da bu sonuçta etkili olmuş olabilir.

Elektron mikroskopi bulgularında; PKOS grubuna ait sıçanlarda teka hücrelerinde aşırı lipid birikimi ve şişmiş, krista yapısı bozulmuş dejenere mitokondri gözlemlenmiştir. Bu durum PKOS'ta görülen teka hücre hiperplazisi ve dolayısıyla hiperandrojenizm kaynaklı olabilir. Çünkü PKOS patojenezinden biri olan hiperandrojenizmde steroid yapıdaki androjenlerin aşırı birikimi sözkonusudur ve teka hücrelerinde normalden fazla lipid damlacığının görülmesi bunun sonucu olabilir. Ayrıca hücredeki aşırı salgı üretimi enerji homeostazından sorumlu mitokondriyonda dejenerasyona yol açmış olabilir. Granüloza hücrelerinde ise hücreler arası alanda artış, normalden fazla lipid damlacığı birikimi, dejenere mitokondri ve çok sayıda sekonder lizozom gözlemlenmiştir. Sekonder lizozomlara bağlı olarak çok sayıda apoptotik granüloza hücresi tespit edilmiştir. Yine bu bulgular da PKOS grubuna ait granüloza hücrelerinde artış gösteren TUNEL(+) hücre sayısı ile paralellik göstermiştir. Bunun yanı sıra bu hücrelerde gER yapısında genişleme tespit edilmiş ve bu bulgu Sun ve arkadaşları tarafından da PKOS grubuna ait sıçanlarda tespit edilmiştir (Sun ve diğ. 2013). Granüloza hücrelerinde görülen bu dejenerasyon ve apoptoz, aromataz enziminin çalışmamasına ve dolayısıyla PKOS'ta görülen aşırı androjen birikimine neden olmaktadır. Oosit incelendiğinde ise zona pellusida ile bağlantısının azaldığı ve yer yer kopmaların olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde zona pellusida ve granüloza hücreleri arasındaki alanda artış gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarında ise teka ve granüloza hücre tabakalarında hücreler arası mesafenin azaldığı, krista yapılarının net seçildiği sağlıklı mitokondri ve gER yapısı gözlemlenmiştir. Apoptotik granüloza hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular PKOS'ta görülen granüloza hücre defektlerinin tedavi grupları tarafından kontrole yakın

indirgendini göstermiştir. Oosit ile onu çevreleyen zona pellusida yapısında ise bütünlük görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile PKOS modeli oluşturulan sıçanlarda primordiyal folikül havuzunun azaldığını, hiperandrojenizm kaynaklı kistik folikül oluşumu ve sekonder folikülden tersiyer foliküle geçişin bloklanması nedeniyle ovulasyonun sekteye uğradığını çeşitli yöntemlerle tespit ettik. Oksidatif stres ve inflamasyon PKOS patojenezinin esasını oluşturduğundan, bu parametreler üzerinde yoğunlaştık. Çalışmamız PKOS modelinde resveratrolün bir inflamasyon belirteci olan TNF- α üzerindeki etkilerine bakıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca bu çalışma resveratrolün bu dozda denendiği ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bunun yanı sıra literatürde PKOS modelinde resveratrol ve metforminin birlikte kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Önemli infertilite sebeplerinden olan PKOS'un halk sağlığına verdiği olumsuz etkilerden ötürü potansiyel tedavi edicilerin araştırılması ve uygun dozunun bulunması gerekmektedir. Bu çalışmada resveratrolün antioksidan etkileriyle SIRT1 yolağı üzerinden oksidatif stresi azaltarak hücre hasarını onardığını, inflamasyonu azalttığını, hormonal bozukluğu dengeye sokup folikülogenez mekanizmasını düzenleyerek PKOS semptomlarını büyük ölçüde ortadan kaldırdığı görülmektedir. Metforminin daha önceki çalışmalarda ispatlanmış olumlu etkileri göz önüne alındığında, resveratrol ile birlikte kombine kullanımının PKOS tedavisinde etkili bir yöntem olacağını düşünmekteyiz

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Polikistik over sendromu üreme çağındaki kadınlarda görülen en yaygın endokrin bozukluklardan biridir ve anovuluar infertilitenin esas nedenidir (Joham ve diğ 2015). PKOS patojenezi kesin olarak tanımlanamamakla birlikte hiperandrojenizm, oksidatif stres ve inflamasyon temel nedenleri arasında gösterilmektedir (Murri ve diğ. 2013, Zhang ve diğ. 2012, Lim ve diğ. 2012, DeGroot 2011, Moran ve diğ. 2010).

Metformin, Tip II diyabet tedavisinde kullanılan antihiperglisemik bir ilaçtır (Essah ve diğ. 2006). Bu ilacın PKOS tedavisinde de yararlı olduğu kanıtlanmıştır. PKOS'lu hastalarla yapılan klinik çalışmalarda metforminin menstrüel siklusu düzenlediği, hiperinsülinemiği iyileştirdiği ve hiperandrojenemiği azalttığı gösterilmiştir (Essah ve diğ. 2006, Moghetti ve diğ. 2000). Metforminin yan etkileri seyrek olmasına rağmen, hastalarda %30'a kadar varan oranda ishal, kramp, bulantı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlar görüldüğü ve uygulanmasının bırakıldığı rapor edilmiştir. Bu nedenle metforminin uygulanması gereken dozun azaltılacağı yeni stratejiler geliştirilmelidir (Okayasu ve diğ. 2012).

Resveratrol (3,5,4 trihydroxystilbene), bakteri ya da mantar gibi patojen saldırılarına karşı çeşitli bitkiler tarafından fitoaleksinin olarak sentezlenen doğal bir polifenoldür. SIRT1 aktivatörü olan bu biyoflavonoid dut, fıstık, üzüm ve dolayısıyla kırmızı şarapta doğal olarak bulunur (Baur ve Sinclair 2006). Resveratrolün anti-karsinogenik, anti-oksidant, anti-inflamatuvar, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkileri bulunmaktadır (Nassiri-Asl ve Hosseinzadeh 2009, Yousuf ve diğ. 2009).

Bu çalışmada resveratrolün, diğer ovaryum çalışmalarına göre farklı dozu denenerek tek başına ve metforminle birlikte PKOS üzerindeki potansiyel iyileştirici etkileri değerlendirildi. PKOS'un dünyadaki kadınların yaklaşık %5-10'unu etkilediği göz önüne alındığında, infertilite nedeni olan bu hastalığa karşı tedavi edici önlemlerin alınması gerekmektedir. Resveratrolün doğal bir antioksidan oluşu, daha önceki in vitro çalışmalarda steroidogenez üzerindeki potansiyel iyileştirici etkilerinin gözlemlenmesi bize bu polifenolün PKOS tedavisinde etkili bir ajan olabileceğini düşündürmüştür ve elde ettiğimiz bulgular hipotezimizi desteklemiştir. Metformin PKOS'ta görülen insülin direncini düşürmesinin yanı sıra ovulasyonu da düzenlemektedir ancak metforminin PKOS için tam anlamıyla etkili bir tedavi yöntemi olmayışı araştırmacıları yeni arayışlara sokmuştur.

Metformin dozunun azaltılıp resveratrolle birlikte kullanıldığı yeni tedavi yöntemlerinin infertilite etmeni, sistemik ve endokrin olan bu hastalığa çözümde ışık tutacağını düşünmekteyiz. Ancak elde ettiğimiz bu bulguların ileriki klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Aggarwal BB. ve diğ. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004; 24: 2783–2840.
- Alanbay I, Ercan CM, Sakinci M ve diğ. A macrophage activation marker chitotriosidase in women with PCOS: does low-grade chronic inflammation in PCOS relate to PCOS itself or obesity? *Archives of Gynecology & Obstetrics.* 2012; 286(4): 1065–1071.
- Albani D. ve diğ. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors.* 2010; 36(5): 370-6.
- Anthony M. Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas (13.çeviri). McGraw-Hill, New York, 2013.
- Araujo VR ve diğ. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote.* 2013; 21: 295–304.
- Arıncı K ve Elhan A. Anatomi 1. Cilt. Güneş Kitabevi, Ankara, 2001.
- Athar M, Back JH, Tang X ve diğ. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 224: 274-83.
- Atiomo WU, El-Mahdi E ve Hardiman P. Familial associations in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility.* 2003; 80:143-145.
- Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *FertilSteril.* 2001; 76:517–24.
- Aytekin Y ve Solakoglu S. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D ve diğ. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *FertilSteril.* 2009; 91(2): 456–88.
- Balen AH, Tan SL, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone: a significant cause of infertility and miscarriage. *BJOG.* 1993; 100: 1082-1089.
- Banu SK, Stanley JA, Sivakumar KK ve diğ. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Jul 15;303:65-78.
- Barbieri RL. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. *Am College of Obstet and Gynecol.* 2003; 101: 785- 93.
- Baribeau S. ve diğ. Resveratrol inhibits cisplatininduced epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cell lines. *PLoS One* 2014; 9: e86987.
- Bargiota A ve Diamanti Kandarakis E: The effects of old, new and emerging medicine on metabolic aberration in PCOS. *TherAdvEndocrinolMetab.* 2012; 3: 27 47.
- Basini G ve diğ. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010; 54: S236–S243.
- Baur JA ve Sinclair DA. What is Xenohormesis? *Am J Pharmacol Toxicol.* 2008 Mar 31;3(1):152-159.
- Benrick A, Maliqueo M, Miao S ve diğ. Resveratrol is not as effective as physical exercise for improving reproductive and metabolic functions in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:964070.

- Bhide P, Dilgil M, Gudi A ve diğ. Each small antrafollicle in ovaries of women with polycystic ovary syndrome produces more antimüllerian hormone than its counterpart in a normal ovary: an observational cross-sectional study. *Fertil. Steril.* 2014; doi:10.1016/j.fertnstert. 2014.10.033.
- Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG ve diğ. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(6): 673-683.
- Borra MT, Smith BC ve Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry.* 2005; 280(17): 17187–17195.
- Boulman N, Levy Y, Leiba R ve diğ. Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2004;89(5): 2160-2165.
- Boyle JG, Salt IP, McKay GA. Mef2 action on AMP-activated protein kinase: a translational research approach to understanding a potential new therapeutic target. *Diabet Med.* 2010; 27: 1097–106.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ ve diğ. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006; 12: 685–718.
- Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS ve diğ. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends EndocrinolMetab.* 2008; 19(9): 340-347.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
- Bujanda L, Hijona E, Larzabal M ve diğ. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol.* 2008; 8: 40.
- Bulut G, Kurdoglu Z, Dönmez YB ve diğ. Effects of jnk inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome. *International journal of clinical and experimental pathology,* 2015; 8(8), 8774.
- Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 381(2): 253-63.
- Cadenas S ve Barja G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative. DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1531-1537.
- Calkins CM, Bensard DD, Heimbach JK ve diğ. L-arginine attenuates lipopolysaccharide induced lung chemokine production. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001;280(3):L400-408.
- Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the Mouse: relative influence of continuous light and the presence of male. *Biol. Reprod.* 1976; 14: 292-9.
- Canto C, Auwerx J. PGC-1α, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr.Opin.Lipidol.* 2009; 20(2): 98–105.
- Carlsen SM, Vanky E, Fleming R. Anti-Müllerian hormone concentrations in androgen-suppressed women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2009; 24(7):1732–8.
- Carter LG, D’Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence *Endocr. Relat. Cancer.* 2014; 21: 209– 225.
- Cenesiz S, Yarim GF, Karabulut AB ve diğ. Changing of antioxidant enzyme activity on the biliary obstructed rats treated with resveratrol. *DtschTierarztWochenschr.* 2007; 114: 345–348.
- Champlin AK, Dorr DL. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. *BiolReprod.* 1973; 8: 491-4.

Cheserek MJ, Wu G, Li L ve diğ. Cardioprotective effects of lipoic acid, quercetin and resveratrol on oxidative stress related to thyroid hormone alterations in long-term obesity. *J Nutr Biochem*. 2016 Jul;33:36-44.

Chereau A, M'emoires pour Servir `a. Etude des Maladies des Ovaires. Fortin Masson, France, 1844.

Chung JH ve diğ. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends Cell Biol*. 2012; 22(10): 546-54.

Clément F, Monniaux D, Thalabard JC ve diğ. Contribution of a mathematical modelling approach to the understanding of the ovarian function. *C R Biol*. 2002; 325: 473-485.

Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol*. 1994; 4: 315-324.

Covington JD, Ravussin E, ve Redman LM. Reduced expression of SIRT1 and SIRT3 in the skeletal muscle of PCOS women. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting and Expo (ENDO '12). San Francisco, Calif, USA, 2013.

Csiszar A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2011; 1215: 117-122.

Curry TE, Dean DD, Sanders SL. The role of ovary proteases and their inhibitors in ovulation. *Steroids*. 1989; 54: 501-521.

Moore KL ve Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri. Çev. Dalçık H. ve Yıldırım M. İstanbul, 2009.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D. ve diğ. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *ClinicaChimicaActa*. 2003; 329 (1-2): 23-38.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R. ve diğ. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(4): 601-623.

Dani C, Oliboni LS, Pasquali MA ve diğ. Intake of purple juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. *J Med Food*. 2008; 11: 127- 132.

De La Lastra CA ve Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *BiochemSoc Trans*. 2007; 35(5): 1156-60.

De Bont R. ve Van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004; 19(3): 169-185.

DeGroot PCM, Dekkers OM, Romijn JA, ve diğ. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and metaanalysis. *Human Reproduction Update*. 2011; 17(4): 495-500.

De Vet A, Laven JS, De Jong FH ve diğ. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *FertilSteril*. 2002; 77(2): 357-362.

Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık. İstanbul, 2006.

Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K ve diğ. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Human Reproduction*. 2006; 21(6): 1426-1431.

Dorostghoal M, Mahabadi MK, Adham S. Effects of maternal caffeine consumption on ovarian follicle development in wistar rats offspring. *J Reprod Infertil*, 12(1), 15-22, 2011.

Du DF, Li XL, Fang F ve diğ. Expression of anti-Müllerian hormone in letrozole rat model of polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 2014; 30(12), 885-889.

- Duleba AJ ve diğ. Effects of insulin and insulinlike growth factors on proliferation of rat ovarian thecainterstitial cells. *Biol. Reprod.* 56: 891–897, 1997.
- Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I ve diğ. Metformin-Clinical Pharmacology in PCOs. *Journal of medicine and life.* 2015; 8(2): 187.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction.* 124(5): 601–9, 2002.
- Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *J. Med.* 2005; 352: 1223-1236.
- Eilertsen TB, Vanky E, Carlsen SM. Anti-Mullerian hormone in the diagnosis of polycystic ovary syndrome: can morphologic description be replaced? *Hum Reprod.* 2012; 27(8): 2494-2502.
- Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Gal De Meyts ER ve diğ. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J ClinEndocrinolMetab.* 1999; 84(10): 3836-3844.
- Ergenoglu M, Yildirim N, Yildirim AGS ve diğ. Effects of resveratrol on ovarian morphology, plasma anti-mullerian hormone, IGF-1 levels, and oxidative stress parameters in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Reproductive Sciences,* 2015; 1933719115570900.
- Escobar-Morreale HF, Calvo RM, Villuendas G ve diğ. Association of polymorphisms in the interleukin 6 receptor complex with obesity and hyperandrogenism. *Obes Res.* 2003; 11: 987-996.
- Essah PA, Apridonidze T, Iuorno MJ ve diğ. Effects of short-term and long-term metformin treatment on menstrual cyclicity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2006 Jul;86(1):230-2.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18.10: 872-879.
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C ve diğ. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer.* 2007; 121(11): 2381–2386.
- Feyereisen E, Me´ndez Lozano DH, Taieb J ve diğ. Anti-Mullerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12:695–703.
- Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable Human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res.* 2005; 65: 10457–10463.
- Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Elsevier. USA, 2007.
- Gedik E, Girgin S, Ozturk H ve diğ. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alternations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 7101–7106.
- Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW ve diğ. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J ClinEndocrinolMetab.* 1994; 79(4): 1158–65.
- Gonz´alez F, Rote NS, Minium J ve diğ. Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Metabolism: Clinical&Experimental.* 2009; 58(7): 954–962.
- Gonz´alez F, Sreekumaran Nair K, Daniels J. K ve diğ. Hyperandrogenism sensitizes mononuclear cells to promote glucose-induced inflammation in lean reproductive-age women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2012; 302(3): E297–E306.
- Gonz´alez F. Inflammation in polycystic ovary syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids.* 2012; 77(4): 300–305.

González F, Nair KS, Daniels JK ve diğ. Hyperandrogenism sensitizes leukocytes to hyperglycemia to promote oxidative stress in lean reproductive-age women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012; 97(8). 2836–2843.

Gökmen G. Sistemik Anatomi. İzmir Güven Yayınevi, 2003.

Guarente L, Picard F. Calorie restriction – the SIR2 connection. *Cell*. 2005; 120: 473–482.

Guo R. ve diğ. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Med. Sci. Monit. Basic Res*. 2014; 20: 82–92.

Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure– activity insight. *Innov Food Sci Emerg*. 2010; 11: 210–218.

Gürgen SG, Erdoğan D, Elmas C ve diğ. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium. *Nutrition*. 2013; 29(5): 777-784.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 2007; 35(5): 1147-1150.

Haohao Z. ve diğ. Resveratrol improves high-fat diet induced insulin resistance by rebalancing subsarcolemmal mitochondrial oxidation and antioxidant. *J. Physiol. Biochem*. 2015; 71: 121–131.

Harati K. ve diğ. Resveratrol induces apoptosis and alters gene expression in human fibrosarcoma cells. *Anticancer Res*. 2015; 35: 767–774.

Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 1972;48(2):422-427.

Hassan-Khabbar S, Cottart C, Wendum D ve diğ. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl*. 2008; 14:451–459.

Hattori R ve diğ. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: H1988-1995.

HealthyAndNaturalWorld.com

Hiraku Y. ve Kawanishi S. Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 2009; 512: 3–13.

Holmes-McNary M, Baldwin AS. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Res*. 2000; 60: 3477–3483.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY ve diğ. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425: 191–196.

http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/CH27_Ovarian_Follicles.htm

http://www.slideshare.net/ocfertility/polycystic-ovary-syndrome-pcos?next_slideshow=1

<https://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>

<https://www.permanence.com.au>

Hu J, Yang J, Xu W ve diğ. Study on the changes and clinical significance of serum transforming growth factor-beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the patients with polycystic ovary syndrome. *Chin J Birth Health Hered*. 2004; 12: 107-109.

Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem*. 2005; 80 (2):79-87.

- Hunter MH and Sterrett JJ. Polycystic ovary syndrome: it's not just infertility. *American Family Physician*. 2000; 62: 1088-1090.
- Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, ve diğ. Can anti- Mullerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *J ClinEndocrinolMetab*. 2013; 98(8): 3332-3340.
- Itami N. ve diğ. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*. 2015; 83: 1360–1367.
- Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S ve diğ. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J ClinEndocrinolMetab*. 2002; 87: 524- 29.
- Jang M, Cai L, Udeani GO ve diğ. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997; 275: 218–220.
- Jang M, Lee MJ, Lee JM ve diğ. Oriental medicine Kyung-Ok-Ko prevents and alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats. *PLoS ONE*. 2014 Feb 10;9(2):e87623.
- Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction-oxidant stress, aging and exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1993; 25 (5): 653-653.
- Joham AE, Teede HJ, Ranasinha S ve diğ. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: data from a large community-based cohort study. *Journal of Women's Health*. 2015; 24(4): 299–307.
- Kai Y, Kawano Y, Yamamoto H ve diğ. A possible role for AMP-activated protein kinase activated by metformin and AICAR in human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015; 13(1): 1.
- Kamat, BR ve diğ. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am. J. Pathol*. 1995; 146: 157–165.
- Karin M. ve diğ. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; 2: 301–310.
- Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E ve diğ. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*. 2007; 80:1033–1039.
- Kebapcilar AG, Tatar MG, Ipekci SH ve diğ. Cornea in PCOS patients as a possible target of IGF-1 action and insulin resistance. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2014; 290(6): 1255–1263.
- Keith L ve Moore TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (9. Baskı). PA: Elsevier, 2011.
- Kelly CCJ, Lyall H, Petrie JR ve diğ. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001; 86(6), 2453-2455.
- Kim IY, He YY. Targeting the AMP-activated protein kinase for cancer prevention and therapy. *Frontiers in oncology*. 2013;3: 175.
- Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y ve diğ. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *BiochemBiophys Res Commun*. 2008; 373: 423–428.
- Kondratyuk TP ve diğ. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *MolNutr Food Res*. 2011; 55: 1249–1265.
- Kong XX, Fu YC, Xu JJ ve diğ. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. *J. Endocrinol. Invest*. 2011; 34: 374– 381.

- Kousta E, Tolis G, Franks S. Polycystic ovary syndrome. Revised diagnostic criteria and long-term health consequences. *HORMONES-ATHENS-*, 2005; 4(3): 133.
- Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D ve diğ. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod Biol Endocrinol.*2003 Mar 24;1:30.
- Ladson G, Dodson WC, Sweet SD ve diğ. The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: A randomized double blind study. *FertilSteril.* 2011; 95: 1059 1066.
- Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N ve diğ. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2008; 283(41): 27628–27635.
- Langcake P, Cornford C, Pryce R. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitisvinifera* leaves. *Phytochemistry.* 1979; 18: 1025–1027.
- Laven JS, Mulders AG, Visser JA ve diğ. Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J ClinEndocrinolMetab.*2004; 89(1): 318–23.
- Lee D ve Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *J. Biol. Chem.* 2013. 288: 30515–30526.
- Legro RS, Zaino RJ, Demers LM ve diğ. The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovary and endometrium in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196: 402- 407.
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH ve diğ. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *BiochemBiophys Res Commun.* 2003; 309: 1017–1026.
- Leong CW ve diğ. Effect of resveratrol on proliferation and differentiation of embryonic cardiomyoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 360: 173–180.
- Li A, Zhang S, Li J ve diğ. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Jun 5. pii: S0303-7207(16)30208-8.
- Li J ve diğ. Radioprotective and Antioxidant Effect of Resveratrol in Hippocampus by Activating Sirt1. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(4): 5928-39.
- Li L. ve diğ. Disrupting androgen production of Leydig cells by resveratrol via direct inhibition of human and rat 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Toxicol. Lett.*2014; 226: 14–19.
- Li Q, Geng X, Zheng W ve diğ. Current understanding of ovarian aging. *China Life.* 2012; 55: 659–669.
- Lie Fong S, Schipper I, de Jong FH ve diğ. Serum anti-Mullerian hormone and inhibin B concentrations are not useful predictors of ovarian response during ovulation induction treatment with recombinant follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *FertilSteril.* 2011; 96(2): 459–63.
- Lim SS, Davies MJ, Norman RJ ve diğ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update.*2012; 18(6): 618–637.
- Liu BL. ve diğ. New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anticancer therapy. *Cancer Biol. Ther.*2007; 6: 1833–1836.
- Liu Y. ve diğ. Resveratrol protects mouse oocytes from methylglyoxal-induced oxidative damage. *PLoS One* 2013; 8: e77960.
- Luft R. The development of mitochondrial medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1994; 91.19: 8731-8738.

- Ma R. ve diğ. Sirt1 protects pig oocyte against in vitro aging. *Anim. Sci. J.* 2015.
- MacCarrone M. ve diğ. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur. J. Biochem.* 1999; 265: 27–34.
- Mahesh VB, Greenblatt RB, Scholer HFI ve diğ. Steroid and gonadotropin secretion in the polycystic ovary syndrome. In: Recent Advances in Endocrinology. *Excerpta Medica Internat'l Cong*, 1970; 238, pp. 160–167.
- Maheshwari A, Gibreel A, Bhattacharya S ve diğ. Dynamic tests of ovarian reserve: a systematic review of diagnostic accuracy. *Reprod Biomed Online.* 2009;18: 717–34.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 2000; 164: 6509–6519.
- Martin M, Marais R. Metformin: a diabetes drug for cancer, or a cancer drug for diabetics?. *Journal of Clinical Oncology*, 2012; 30(21): 2698-2700.
- Massimo de F. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction.* 2010; 16(9): 632-636.
- Masszi G, Novak A, Tarszabo R ve diğ. Effects of vitamin D3 derivative—calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. *Pharmacological Reports.* 2013; 65(2): 476–483.
- Medigović I, Ristić N, Trifunović S ve diğ. Genistein affects ovarian folliculogenesis: a stereological study. *Microsc Res Tec.* 2012; 75(12): 1691-1619.
- Moggetti P, Castello R, Negri C ve diğ. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jan;85(1):139-46.
- Moran LJ, Misso M.L, Wild RA ve diğ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update.* 2010; 16(4): 347–363.
- Morita Y. ve diğ. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012; 10: 14.
- Mukherjee S ve diğ. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response.* 2010; 8(4): 478-500.
- Murri M, Luque-ramírez M, Insenser MM ve diğ. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update.* 2013; 19(3): 268–288.
- Nasiri N, Moini A, Eftekhari-Yazdi P ve diğ. Abdominal obesity can induce both systemic and follicular fluid oxidative stress independent from polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology.* 2015;184: 112–116.
- Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res.* 2009 Sep;23(9):1197-204.
- Neagu M, Cristescu C. Anti-Müllerian hormone--a prognostic marker for metformin therapy efficiency in the treatment of women with infertility and polycystic ovary syndrome. *J Med Life.* 2012, Dec 15;5(4):462-4.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ. Decreases in ovarian cytochrome P450c17a and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1996; 335: 617–23.

- Ning J, Clemmons DR. AMP-activated protein kinase inhibits IGF-I signaling and protein synthesis in vascular smooth muscle cells via stimulation of insulin receptor substrate 1 S794 and tuberous sclerosis 2 S1345 phosphorylation. *MolEndocrinol*. 2010; 24: 1218–29.
- Nisenblat V, Norman RJ. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2009; 16(3): 224–231.
- Nobili S, Lippi D, Witort E ve diğ. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 2009;59(6):365-378.
- Okayasu S, Kitaichi K, Hori A ve diğ. The evaluation of risk factors associated with adverse drug reactions by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35(6): 933–937.
- Ortega I, Duleba AJ. Ovarian actions of resveratrol. *Newyork Academy of Science*. 2015; 1348(2015) 86-96.
- Ortega I. ve diğ.. Effects of resveratrol on growth and function of rat ovarian granulosa cells. *Fertil. Steril*. 2012; 98: 1563– 1573.
- Ortega I, Villanueva JA, Wong DH ve diğ. Resveratrol potentiates effects of simvastatin on inhibition of rat ovarian theca-interstitial cells steroidogenesis. *Journal of ovarian research*. 2014; 7(1): 1.
- Ovalle WK ve Nahirney PC. Netter's Essential Histology. 2nd edition. Saunders, 2013.
- Palomba S, Orio Jr F, Falbo A ve diğ. Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first-line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *J ClinEndocrinolMetab*. 2005; 90: 4068–74.
- Parahuleva N, Pehlivanov B, Dimitrakova E ve diğ. Anti-Mullerian hormone- its role in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome. *AkushGinekol*. 2012; 51: 22–6.
- Parhizkar S, Latiff LA. Supplementary Health Benefits of Linoleic Acid by Improvement of Vaginal Cornification of Ovariectomized Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013; 3(1): 31-36.
- Pavlova, S. ve diğ. The involvement of SIRT1 and transcription factor NF-kappaB (p50/p65) in regulation of porcine ovarian cell function. *Anim. Reprod*. 2013; 140: 180– 188.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M ve diğ. Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J ClinEndocrinolMetab*. 2007; 92(1): 240–5.
- Peral B, San Millan JL, Castello R ve diğ. The methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *J ClinEndocrinolMetab*. 2002; 87: 3977-3983.
- Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox Signal*. 2009; 11: 2851–2897.
- Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S ve diğ. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *ProcNatAcadSci*. 2008; 105: 9793–9798.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y ve diğ. Elevated serum level of antimullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J ClinEndocrinolMetab*. 2003; 88: 5957–62.
- Pisoschi AM ve Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 97: 55–74.
- Purushotham A, Schug TT, Xu Q ve diğ. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. 2009; 9: 327–338.

- Qiang L. ve diğ. Proatherogenic abnormalities of lipid metabolism in SirT1 transgenic mice are mediated through Crebdeacetylation. *Cell Metabol.* 2011; 14: 758–767.
- Randolph JF Jr, Kipersztok S, Ayers JW ve diğ. The effect of insulin on aromatase activity in isolated human endometrial glands and stroma. *Am J ObstetGynecol.* 1987; 157: 1534–1539.
- Rao RP ve Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health.* 2002; 40: 237-44.
- Rege SD, Kumar S, Wilson DN ve diğ. Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:419092.
- Repaci A, Gambineri A, Pasquali R. The role of lowgrade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2011; 335(1): 30–41.
- Rivera H, Shibayama M, Tsutsumi V ve diğ. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl4 in the rat. *J ApplToxicol.* 2008; 28: 147–155.
- Ross M.H. Histology: A text and Atlas. (4.Baskı). Philadelphia: Lippincott William&Wilkins. 2011.
- Roos N, Kieler H, Sahlin L ve diğ. Risk of adverse pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: population based cohort study. *BMJ.* 2011; 343: d6309.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS ConsensusWorkshop Group, “Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-termhealth risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction.* 2004; 19(1): 41–47.
- Rubiolo JA, Mithieux G, Vega, FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European journal of pharmacology.* 2008; 591(1): 66-72.
- Sabuncu T, Harma M, Harma M ve diğ. Sibutraminehas a positive effect on clinical and metabolic parameters in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Steril.* 2003; 80: 1199-1204.
- Sadler TW. Langman's medical embryology. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2010.
- Saleh MC ve diğ. Co-administration of resveratrol and lipoic acid, or their synthetic combination, enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. *PLoS One.* 2014; 9: e87865.
- Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl).* 2011; 89(7): 667–676.
- Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol.* 2004; 266(1): 201–8.
- Sang MS, Il JC, Sang GK. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. *Molecular Pharmacology.* 2009; 76(4):884–895.
- Savic-Radojevic A, Bozic Antic I, Coric V ve diğ. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on glutathione peroxidase activity in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Hormone.* 2015; 14(1): 101–108.
- Schaafsma D, McNeill KD, Mutawe MM ve diğ. Simvastatin inhibits TGFbeta1-induced fibronectin in human airway fibroblasts. *Respir Res.* 2011; 12: 113.
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J DermatolSci.* 2004; 35: 83-92.

- Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly (ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. *Molecular pharmacology*. 2009; 76(4): 884-895.
- Singh UP, Singh NP, Singh B ve diğ. Resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor- κ B activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;332(3): 829-839.
- Singh CK. ve diğ. Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Mol. Nutr. Food Res*. 2011. 55: 1186–1196.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*.2015; 71:40– 56.
- Skov V, Glintborg D, Knudsen S ve diğ. Reduced expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 2007; 56(9): 2349– 2355.
- Snell GD. Reproduction. Biology of Mouse (2.Baskı). Dover Publications; 1956, USA.
- Snell RS. Clinical Anatomy for Medical Students. 5th edition, Little Brown, 1995.
- Solano ME, Sander VA, Ho H, ve diğ. Systemic inflammation, cellular influx and up-regulation of ovarian VCAM-1 expression in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Journal of Reproductive Immunology*. 2011; 92(1-2): 33–44.
- Soner BC ve Şahin AS. Cardiovascular effects of resveratrol and atorvastatin treatments in an H₂O₂-induced stress model. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2014; 8: 1660-1664.
- Souza IC. ve diğ. Resveratrol inhibits cell growth by inducing cell cycle arrest in activated hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biochem*. 2008; 315: 1–7.
- Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ. Tumor necrosis factor- α stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biology of Reproduction*. 1999; 61(4): 993–998.
- Spaczynski RZ. ve diğ. Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca-interstitial cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod*. 2005; 11: 319– 324.
- Standring S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 39th edition, Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- Stein IF ve Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *AJOG*. 1935; 29:181.
- Stumvoll M, Nuriyhan N, Perriello G ve diğ. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995; 333:550–4.
- Sun J, Jin C, Wu H ve diğ. Effects of Electro-Acupuncture on Ovarian P450arom, P450c17a and mRNA Expression Induced by Letrozole in PCOS Rats. *PLOS ONE*.2013; 8:11-e 79382.
- Sun L, Ji C, Jin L ve diğ. Effects of Exenatide on Metabolic Changes, Sexual Hormones, Inflammatory Cytokines, Adipokines, and Weight Change in a DHEA-Treated Rat Model. *Reproductive Sciences*, 2016; 1-8.
- Supornsilchai V. ve diğ. Phytoestrogen resveratrol suppresses steroidogenesis by rat adrenocortical cells by inhibiting cytochrome P450 c21-hydroxylase. *Horm. Res*. 2005; 64: 280– 286.
- Tatone C. ve diğ. Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2015: 659687.

- Tezil T ve Basaga H. Modulation of cell death in age-related diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2014; 20(18): 3052–3067.
- Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S ve diğ. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *BiolReprod*. 2007; 76: 368–78.
- Tosca L, Rame C, Chabrolle C ve diğ. Metformin decreases IGF1-induced cell proliferation and protein synthesis through AMP-activated protein kinase in cultured bovine granulosa cells. *Reproduction*. 2010; 139: 409–18.
- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2005; 14(2): 125–131.
- Villuendas G, San Millán JL, Sancho J ve diğ. The -597 G->A and-174 G->C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *J ClinEndocrinolMetab*. 2002; 87: 1134-1141.
- Viollet B, Mounier R, Leclerc J ve diğ. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes Metab*. 2007; 33: 395–402.
- Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American*, 1997; 277(2), 40-59.
- Waugh A ve Grant A. Ross and Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness. 9th edition, Churchill Livingstone, 2001.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR ve diğ. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10: 77–83.
- Willis DS, Watson H, Mason HD ve diğ. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J ClinEndocrinolMetab*. 1998; 83(11): 3984–91.
- Wilking MJ. ve diğ. SIRT1 deacetylase is overexpressed in human melanoma and its small molecule inhibition imparts anti-proliferative response via p53 activation. *Arch. Biochem. Biophys*. 2014. 563: 94–100.
- Wong DH, Villanueva JA, Cress AB ve diğ. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. *Molecular Human Reproduction*. 2010; 16(4): 251–259.
- Wu XP ve diğ. Resveratrol induces apoptosis of human chronicmyelogenous leukemia cells invitro through p38 and JNK-regulatedH2AXphosphorylation.*Acta Pharmacol*. 2015; 36: 353–361.
- Xia N, Daiber A, Habermeier A ve diğ. Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2010. 335, 149–154.
- Xinlin Z, Chengwei Z, Shanmei S ve diğ. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Human Reproduction*. 2013;28 : 3074–3085.
- Xiong YL, Liang XY, Yang X ve diğ. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011; 159(1): 148-150.
- Yang H, Sung SH, Kim YC. Two new hepatoprotective stilbene glycosides from Acer mono leaves. *J Nat Prod*. 2005; 68:101– 103.
- Yang R, Zhang H, Zhu L. Inhibitory effect of resveratrol on the expression of the VEGF gene and proliferation in renal cancer cells. *Mol. Med. Rep*. 2011; 4: 981–983.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS ve diğ. Modulation of NF-[kappa]B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 2004; 23: 2369–2380.

Yıldırım M. Topografik Anatomi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000.

Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T ve diğ. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2009; 29: 1363–1374.

Yousuf S, Atif F, Ahmad M ve diğ. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res.* 2009 Jan 23;1250:242-53.

Yu HB. ve diğ. Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepatology.* 2010; 57: 1241– 1246.

Zhang J, Fan P, Liu H ve diğ. Apolipoprotein A-I and B levels, dyslipidemia and metabolic syndrome in south-west Chinese women with PCOS. *Human Reproduction.* 2012; 27(8): 2484–2493.

Zhao F. ve diğ. Roles of SIRT1 in granulosa cell apoptosis during the process of follicular atresia in porcine ovary. *Anim. Reprod. Sci.* 2014; 151: 34–41.

Zhou G, Myers R, Li Y ve diğ. Role of AMPactivated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1167–74.

Zhu X, Liu Q, Wang M ve diğ. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF-alpha induced inflammation in fibroblasts. *PLoS ONE* 2011; 6: e27081.

Zuo Tao, Minghui Zhu ve Wenming Xu. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016. 8589318.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : H.Selenay FURAT RENÇBER

Doğum Yeri ve Tarihi : Fatih/ 06.10.1990

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Evli

Çalıştığı Kurum : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi

İletişim Adresi ve telefonu : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı / 0262 303 73 45

Eğitimi

2004-2008/ Nişantaşı Nuri Akın Anadolu Lisesi

2008-2012/ Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

2012-2014/İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

2014- / Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dili : İngilizce

Unvanları

2014- / Araştırma Görevlisi

Mesleki Deneyimi

2014- / Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

THED(Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği)

TEMD(Türk Elektron Mikroskopi Derneği)

Bilimsel Etkinlikler

Yayımlar:

1- Histologic and Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration Between Bone Morphogenetic Protein-2 and Platelet-Derived Growth Factor-BB in Experimental Groups".Gökhan GÜVEN, Alper GÜLTEKİN, Gamze ŞENOL GÜVEN, Elif GÜZEL, Selenay FURAT, Selim ERSANLI, The Journal of Craniofacial Surgery, 2016 May;27(3):805-9.

2- Ticagrelor Attenuates Apoptosis of Lung and Myocardial Cells Induced by Abdominal Aorta Ischemia/Reperfusion". Orhan FINDIK, Atike TEKELİ KUNT, Yusufhan YAZIR, Melda YARDIMOĞLU, Seda GÜLEÇ YILMAZ, Ufuk AYDIN, Selenay FURAT RENÇBER, Canan BALCI, Turgay İŞBİR, In Vivo (Athens, Greece) 2016 05-06;30(3):243-249.

3- Metaphors About Histology Education in Medical Students”, Ayşegül AYTEKİN, Mehmet Hamdi AYTEKİN, Yusufhan YAZIR, Kübra KAVRAM, Rabia TAŞDEMİR, Hümeyra Selenay FURAT RENÇBER, Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, The Turkish Online Journal of Educational Technology (TOJET), August 2015, Special Issue for INTE 2015; ISSN: 214657242, 352-356,2015.

Bildiriler:

1-Immunohistochemical Analyses of Etanercept's Effects on Vascular Smooth Muscle eNOS Expression in Obese Rats", Yusufhan Yazır, Kübra Kavram, Selenay Furat Rençber, Tuğçe Demirtaş, Tijen Utkan, Cell & Tissue Biology Research,13th National Histology and Embryology Congress with International Participation, 2016.

2- Histologic and Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration Between Bone Morphogenetic Protein-2 and Platelet-Derived Growth Factor-BB in Experimental Groups".Gökhan Güven, Selenay Furat, Elif Güzel, Alper Gültekin, Gamze Şenol Güven, Selim Ersanlı, 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation, 2016.

3-Ticagrelor Attenuates Apoptosis of Lung and Myocardial Cells Induced By Abdominal Aorta Ischemia Reperfusion In A Rat Model."Orhan Fındık, Seda Güleç Yılmaz, Yusufhan Yazır, Melda Yardımoğlu, Ufuk Aydın, Selenay Furat Rençber, Kübra Kavram, Canan Balcı, Atike Tekeli Kunt, Turgay İşbir, 12th International Congress of Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery, March 10-12, www.uccvs2016.org, <http://www.abstractagent.com>. 2016. 79.

4- Metaphors of Medical School Students About Histology", Ayşegül AYTEKİN, Mehmet Hamdi AYTEKİN, Yusufhan YAZIR, Kübra KAVRAM, Rabia TAŞDEMİR, Hümeysra Selenay FURAT RENÇBER, Melda YARDIMOĞLU YILMAZ, Procedia Social and Behavioural Sciences (Proceeding Book). InternationalConference on New Horizons in Education" to be held at Barcelona, Spain on June 10-12,2015.

5-Comprarison of hyperbaric oxygen versus iloprost in experimental central retinal artery occlusion (P-090)", Süleyman KARAMAN, Berna ÖZKAN, Selenay FURAT RENÇBER, Yusufhan YAZIR, Melda YARDIMOĞLU, Özgür KARA, Özgül Altıntaş, Çiğdem VURAL, Salih Kaan EMEK, Kübra KAVRAM, An Intrenational Journal of Experimental and Clinical Anatomy, 13.Turkish Neuroscience Congress, 2015.