

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENİSTTİTÜSÜ**

**FF-MAS OKSİSTEROLÜNÜN FOLİKÜLOGENEZDEKİ ROLÜNÜN VE
HEDGEHOG SİNYAL YOLAĞIYLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Selim ZIRH

Histoloji - Embriyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2021

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENİSTTİTÜSÜ**

**FF-MAS OKSİSTEROLÜNÜN FOLİKÜLOGENEZDEKİ ROLÜNÜN VE
HEDGEHOG SİNYAL YOLAĞIYLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Selim ZIRH

Histoloji - Embriyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sevda Fatma MÜFTÜOĞLU

ANKARA

2021

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FF-MAS OKSİSTEROLÜNÜN FOLİKÜLOGENEZDEKİ ROLÜNÜN VE HEDGEHOG SİNYAL
YOLAĞIYLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ
Selim Zırh
Danışman: Prof. Dr. Sevdâ Fatma Müftüoğlu

Bu tez çalışması 15.04.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Histoloji - Embriyoloji Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof.Dr. Petek Korkusuz</i> (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Prof.Dr. Esra Erdemli</i> (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Prof.Dr. Lale Karakoç Sökmensüer</i> (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç.Dr. İskender Sinan Özkavukçu</i> (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç.Dr. Naciye Dilara Zeybek</i> (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)	

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

29 Nisan 2021

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- ✕ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

28.04.2021

Dr. Selim Zırh

¹ “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Sevda Fatma Müftüoğlu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Selim Zırh

TEŞEKKÜR

Ders dönemim ve tez çalışmam sırasında engin bilgisi ve ileri görüşlülüğü ile daima bana yol gösterici olan danışmanım Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresi boyunca eğitime katkıda bulunan, Prof. Dr. Figen Kaymaz, Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Pergin Atilla, Prof. Dr. Sinan Yürüker, Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer, Doç. Dr. Dilara Zeybek ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Bilgiç hocalarıma teşekkür ederim. Tez çalışmam sürecinde bana çok büyük desteği olan başta eşim Dr. Öğr. Üyesi Elham Bahador Zırh'a ve katkılarını unutmayacağım çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Nilgün Yersal, Dr. Deniz Ekin Erbaş, Dr. Süleyman Erol ve Dr. Sefa Burak Çam'a teşekkür ederim.

Tezim süresince akademik anlamda ufkumu açmasının yanında sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli eşim Dr. Öğr. Üyesi Elham Bahador Zırh'a ve çalışmam için her daim motivasyonumu korumamı sağlayan sevgili kızım Aylin Ela Zırh'a teşekkür ederim.

Hayatımın her devresinde yardımlarını ve varlıklarını yanımda hissettiğim anne-babam ve ablalarım ve ayrıca kardeşim Torkan Bahador'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Zırh, S., FF-MAS Oksisterolünün Folikülogenezdeki Rolünün ve Hedgehog Sinyal Yolağıyla İlişkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. Folikül sıvısında bulunan ve oosit maturasyonunda etkili bir steroid türevi olan FF-MAS oksisterolünün etki mekanizmasıyla ilgili bilgiler sınırlıdır. Hedgehog yolağı (Hh); folikülogenezde kritik öneme sahip granüloza hücre proliferasyonunda etkili bir sinyal yolağıdır ve oosit matürasyonuna katkı sağlar. Hh yolağının hücrede etkisi, transkripsiyon faktörü Gli1'in aktifleşmesini ve hedef genlerin aktivasyonu ile gerçekleşir. Granüloza hücre proliferasyonundaki yetersizlik sebebiyle foliküler gelişimin ilerleyemediği, sonuçta kistik foliküllerin gözlendiği polikistik over sendromu (PKOS) en yaygın endokrin hastalıktır. Çalışmamızda folikülogenezde etkili FF-MAS Hedgehog yolağı aracılığıyla granüloza hücre proliferasyonunu uyarabileceği varsayılmıştır. Bu araştırmanın amacı insan folikülogenezinde, FF-MAS'in granüloza hücre proliferasyonuna etkisini Hedgehog yolağı molekülleri SMO ve Gli1 üzerinden araştırmaktır. Bunun için; sağlıklı ve PKOS hastalarına ait granüloza hücre kültürlerinde, FF-MAS ve yolak inhibitörü siklopaminin SMO ve Gli1 ifadelerine etkisi değerlendirilmiştir. SMO ve Gli1 immünohistokimya ifadeleri ve kantitatif sitoELİZA değerlendirmeleri ile FF-MAS'in bu ifadeleri artırdığı, yolak inhibitörü olan siklopamin uygulanan koşullarda da ifadelerin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı saptanmıştır. Sağlıklı kadınlara ait granüloza hücrelerinin SMO ifade değişimi, yolağın son ürünü olan Gli1 ekspresyon değişiminden daha düşük oranda bulunmuştur. Bu sonuçlar, FF-MAS oksisterolünün Hedgehog yolağını kontrole oranla daha fazla aktive ettiğini göstermektedir. Ayrıca PKOS hastalarının hücreleri FF-MAS'e daha iyi cevap vererek Gli1 ve SMO ifadelerini artırmıştır. Bu veriler daha sonraki çalışmalarda FF-MAS - Hedgehog ilişkisinin *in vivo* olarak ele alınıp, diğer hücre yolaklarıyla da ilişkisinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: folikülogenez, hedgehog sinyal yolağı, oksisterol, FF-MAS, PKOS, Polikistik over sendromu, siklopamin, HGL5

ABSTRACT

Zırh S., Investigation Of FF-MAS Oxysterole's Role in Follicular Development and Its Relation to Hedgehog Signal Pathway, , Hacettepe University Graduate School of Health Science Histology-Embryology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2021.

FF-MAS oxysterol is a derivative of steroid, found in follicular fluid and involved in oocyte maturation. Hedgehog pathway is one of the many cell signaling mechanisms effective in cell proliferation and its effect on the maturation of oocytes has been demonstrated. The effect of Hedgehog ligands in the cell, begins with binding and inhibiting the negative regulatory protein Ptch. Ptch inhibition performs the activation of positive regulatory receptor SMO then activation of the transcription factor Gli1, thus it initiate transcription of the target genes. Granulosa cells are critical cells in follicular development. Cumulus-oocyte complex displaced from Graaf follicle in ovulation; it includes oocyte and granulosa cells. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders today, in which follicular development cannot progress, and resultant cystic follicles are observed. The aim of this research is to investigate the effect of FF-MAS, which plays a role in folliculogenesis, on granulosa cell proliferation through Hedgehog pathway molecules SMO and Gli1. For this purpose; the effect of FF-MAS and pathway inhibitor cyclopamine on SMO and Gli1 expressions was evaluated in cell cultures of granulosa cells from healthy and PCOS patient women.

SMO and Gli1 immunohistochemistry expressions and quantitative cytoELISA evaluations showed that FF-MAS increased these expressions, while cyclopamine decreased the expressions statistically. These results show that in the presence of FF-MAS oxysterol the Hedgehog pathway is more activated than the control. In addition, cells of PCOS patients respond at a higher rate to FF-MAS. These data suggest that the FF-MAS - Hedgehog and other cell signaling pathway relationships should be evaluated *in vivo* in other studies.

Keywords: folliculogenesis, hedgehog signaling pathway, oxysterol, FF-MAS, PCOS, Polycystic ovary syndrome, cyclopamine, HGL5

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryum	4
2.1.1. Ovaryumların Embriyonel Gelişimi	4
2.2. Ovaryum Döngüsü	5
2.2.1. Foliküllerin Gelişimi	5
2.2.2. Folikül Atrezisi veya Dejenerasyonu	8
2.2.3. Ovulatuvar Faz	8
2.2.4. Luteal Faz	8
2.3. Folikülogenez Sırasında Primer Oosit-Granüloza Hücre İletişimi	9
2.4. Polikistik over sendromu (PKOS)	10
2.4.1. PKOS Ayrıcı Tanıları	13
2.4.2. Polikistik Over Morfolojisi	13
2.4.3. İlgili Özellikler ve Morbiditeler	14
2.5. <i>In vitro</i> oosit ve folikül gelişimi	15
2.6. Hedgehog sinyal yolağı	17
2.6.1. Sonic Hedgehog: Embriyogenezde Temel Yolak	18
2.6.2. Hedgehog Sinyal Yolağının Çalışması	18
2.6.3. Hedgehog Yolağı İnhibitörü Olarak Siklopamin	21

2.6.4. Hedgehog sinyal yolağının kanonik olmayan yolları	22
2.7. Oksisteroller	23
2.7.1. Oksisteroller ve İlişkin Patolojiler	25
2.7.2. Mayoz aktive edici oksisteroller: FF-MAS	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Hasta gruplarının belirlenmesi:	27
3.1.2. Deney Guruplarının Belirlenmesi	28
3.1.3. Deney Planı	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Granüloza Hücre İzolasyon Yöntemi	30
3.2.2. Hiyalüronidaz Solüsyonundan Granüloza Hücre İzolasyon Yöntemi	31
3.2.3. Besiyeri Hazırlama	32
3.2.4. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü	33
3.2.5. Granüloza Hücreleri Pasajlanması	33
3.2.6. Granüloza Hücreleri Sayımı	34
3.2.7. Granüloza Hücrelerinin Dondurulması	34
3.2.8. Dondurulmuş Granüloza Hücrelerin Çözülmesi	35
3.2.9. Siklopaminin Hazırlanması	35
3.2.10. FF-MAS'ın Hazırlanması	35
3.2.11. Granüloza Hücre Proliferasyon Değerlendirmesi (Doubling time)	36
3.2.12. Granüloza hücrelerinde etkin FF-MAS dozunun bulunması	36
3.2.13. Primer hücre hatlarında ve HGL5 hücre hattında sitoELİZA	36
3.2.14. HGL5 Hücre Hattı ve Primer Hücre Kültürü Hücrelerinde İmmunositokimya Yöntemlerinin Uygulanması	37
3.2.15. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	42
4.1. Primer Granüloza Hücre Kültürü	42
4.2. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü	45
4.3. Hücre Proliferasyon Değerlendirmesi	45

4.4. Granüloza hücrelerinde etkin FF-MAS dozunun bulunması	46
4.5. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Hücre Hattında İmmünofloresan İşaretleme	47
4.5.1. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında SMO İmmünofloresan Ekspresyonu	47
4.5.2. SMO İmmünofloresan Yoğunluk Analizi	49
4.5.3. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında Gli1 İmmünofloresan Ekspresyonu	51
4.5.4. Gli1 İmmünofloresan Yoğunluk Analizi	53
4.6. Primer Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında İmmünperoksidaz İşaretleme.	55
4.6.1. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında SMO İmmünperoksidaz Ekspresyonu	55
4.6.2. SMO İmmünperoksidaz Yoğunluk Analizi	57
4.6.3. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında Gli1 İmmünperoksidaz Ekspresyonu	58
4.6.4. Gli1 İmmünperoksidaz Yoğunluk Analizi	61
4.7. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Hücre Hattında sitoELİZA Ölçümleri	62
4.7.1. SMO sitoELİZA Sonuçları	62
4.7.2. Gli1 sitoELİZA Sonuçları	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR	73
7. KAYNAKLAR	75
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK-3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMH	: Anti-Müllerien hormon
BMP	: Kemik morfojen protein
CRD	: Sistinden zengin parça
Dhh	: Desert hedgehog
FF-MAS	: Folikül sıvısı mayoz aktive edici sterol
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GC-MS	: Gaz kromatografi-mass spektrometrisi
GDF	: Büyüme farklanma faktörü
Gli	: Glioma ilişkili onkogen
HGL5	: İnsan lüteinize granüloza hücre hattı-5
Hh	: Hedgehog sinyal yolağı
Ihh	: Indian hedgehog
IVF	: In vitro fertilizasyon
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi tandem-mass spektrometrisi
LH	: Luteinleştirici hormon
MAPK	: MAP kinaz
MPF	: Matürasyon uyarıcı faktör
OMI	: Oosit matürasyon inhibitörü
PKOS	: Polikistik over sendromu
PLC-γ	: Fosfolipaz c gama
Ptch	: Patched reseptörü
Shh	: Sonic hedgehog
SMO	: Smoothened reseptörü
T-MAS	: Testiküler mayoz aktive edici sterol
Wnt	: Wingless – Int-1
ZP	: Zona pellusida

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kolajenaz ve DNaz I kullanılarak primer veya sekonder foliküllerin hafif enzimatik sindirimi sonucu, teka hücrelerini dıştan saran bazal membran ve tekal hücre tabakası kaldırılarak granüloza-oosit kompleksleri (GOK'lar) ayrıştırılır.	16
2.2. Sonic hedgehog [Shh] sinyal yolağı; A. Patched proteini Smoothened'ı inhibe eder. Böylece Shh sinyalini ileten GLI proteinlerinin aktivasyonunu bloke olur. B. Shh'un Patched reseptörüne bağlanması, Patched'in Smoothened üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırır. Smoothened'ın aktivasyonu daha sonra DNA'ya bağlanan ve Shh yolağındaki efektör genleri kontrol eden GLI transkripsiyon faktörlerini <i>upregule</i> eder.	18
2.3. Sonic hedgehog ligandının salgılayan hücreden sentezi, postranskripsiyonel modifikasyonu ve hücre dışına verilmesi. Süreçte kolesterolün aldığı rol, görülmektedir.	19
2.4. Smoothened proteini ve hücre dışındaki kısımdaki oksisterol bağlanma bölgesi.	20
2.5. Hedgehog yolağının kanonik olmayan yolları: solda tip 1, sağda tip 2.	23
3.1. Deney planı.	29
3.2. Folikül sıvısından granüloza hücre izolasyonu: A: Santrifüj öncesi tüp görünümü, B: Santrifüj sonrası tüp görünümü.	30
3.3. Hiyalüronidaz solüsyonundan hücre izolasyonu.	32
3.4. Hücre dondurma tüpleri içerisinde dondurulmuş granüloza hücreleri.	35
4.1. Separasyon solüsyonlarına göre izole edilen hücre sayıları.	43
4.2. İzole edilen sağlıklı kadınlara ait granüloza hücrelerinin faz kontrast mikrografları.	44
4.3. HGL5 hücre hattı hücrelerinin T25 flastaktaki faz kontrast mikrografları.	45
4.4. Erkek faktör grubu SMO immünofloresan ekspresyonlarının mikrografları (x40). Yeşil renk membranöz SMO ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.	48
4.5. PKOS grubu SMO immünofloresan ekspresyonlarının mikrografları (x40). Yeşil renk membranöz SMO ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.	48
4.6. HGL5 hücre hattı SMO immünofloresan ekspresyonları mikrografları (x40). Yeşil renk membranöz SMO ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.	49

- 4.7.** Erkek faktör grubu Gli1 immüno Floresan ekspresyonları mikografları (x40). Yeşil renk sitoplazmik ve çekirdekteki Gli1 ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir. 52
- 4.8.** PKOS grubu Gli1 immüno Floresan ekspresyonları mikografları (x40). Yeşil renk sitoplazmik ve çekirdekteki Gli1 ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir. 52
- 4.9.** HGL5 hücre hattı Gli1 immüno Floresan ekspresyonları mikografları (x40). Yeşil renk sitoplazmik ve çekirdekteki Gli1 ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir. 53
- 4.10.** Erkek faktör grubu SMO immünperoksidaz ekspresyonları mikografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir. 55
- 4.11.** PKOS grubu SMO immünperoksidaz ekspresyonları mikografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir. 56
- 4.12.** HGL5 hücre hattı SMO immünperoksidaz ekspresyonları mikografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir. 56
- 4.13.** Erkek faktör grubu Gli1 immünperoksidaz ekspresyonları mikografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir. 59
- 4.14.** PKOS grubu Gli1 immünperoksidaz ekspresyonları mikografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir. 60
- 4.15.** HGL5 hücre hattı Gli1 immünperoksidaz ekspresyonları mikografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir. 60
- 4.16.** Tez çalışmasının şekille özetlenmesi. İn vitro FF-MAS verilmesi ile SMO ve Gli1 ifadelerinde yükselme izlenmiştir. FF-MAS in gözlenen bu etkisinin ligand düzenlenmesindeki rolü yada SMO proteinine bağlanması sonucu olabilir. 65

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. PKOS için tanı kriterleri.	12
2.2. Sonic hedgehog yolağının görev aldığı embriyonel gelişim süreçleri.	17
2.3. En bilinen oksisteroller, kısaltmaları ile ilişkin oldukları metabolik durum ve patolojiler.	24
3.1. Deney gruplarının dağılımı.	28
4.1. Separasyon solüsyonlarına göre izole edilen hücre sayıları ($\times 10^3$).	42
4.2. Kontrol, PCOS ve HGL5 hücrelerinin WST sonuçları.	46
4.3. 48. Saat FF-MAS dozunun WST sonuçları. Birinci çizgi kontrol grubuna, ikinci çizgi PCOS grubuna, üçüncü çizgi ise HGL5 hücre hattına aittir.	46
4.4. Ana gruplara ait alt grup immünofloresan SMO ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.	51
4.5. Ana gruplara ait alt grup immünofloresan Gli1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.	54
4.6. Ana gruplara ait alt grup immünperoksidaz SMO ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.	58
4.7. Ana gruplara ait alt grup immünperoksidaz Gli1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.	62
4.8. Ana gruplara ait alt grup sitoELİZA SMO ekspresyon ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması.	63
4.9. Ana gruplara ait alt grup sitoELİZA Gli1 ekspresyon ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması.	65

1. GİRİŞ

Over histolojik yapısı ve fonksiyonu açısından en önemli hücrelerinden olan granüloza hücreleri, oositin etrafında yer alarak, oosite yapısal ve fonksiyonel destek sağlar. Epitel özelliği gösteren granüloza hücreleri, bazal laminası ile oosite madde geçişinde kontrol sağlar ve folikül sıvısını üretir. Oositin puberteye kadar mayozun profaz I evresinde kalması ve daha sonrasında mayoz bölünmenin devam etmesi için hormonal kontrol altında faktörler üretir. Bu görevleri ve fertilitenin sağlanması için granüloza hücreleri kritik önem taşır (1).

Polikistik over sendromu (PKOS) hiperandrojenemi (klinik veya biyokimyasal), oligomenore veya amenore, ultrason incelemesinde yumurtalık kistlerinin (en az 18 tane) görülmesi ile karakterize olan üreme çağındaki kadınlarda % 5-10 insidansa sahip bir hastalıktır ve over kaynaklı infertilitenin başlıca sebeplerindendir (2). Normalde 1 yada 2 tane görülen Graaf folikülünün aksine fazla miktarda bulunan PKOS hastalığı kistik foliküllerinde 2-9 mm çap, bir yada iki sıra granüloza hücre tabakası ve çok geniş bir antrum görülmektedir. Metabolik, hormonal ve yapısal etkilerinin bulunması, birçok moleküler mekanizmanın patofizyolojisinde yer alması sebebiyle PKOS hakkında yapılan bir çok klinik ve preklinal çalışma mevcuttur ancak halen hastalığın etyopatogenezi tam olarak açığa çıkmamıştır (3).

Hedgehog geni (Hh), 1978 yılında Eric Wieschaus ve Christiane Nusslein-Volhard tarafından drosophiliada tanımlanmıştır (4). Embriyolojik gelişimde nöral tüp (5), sindirim kanalı (6), iki göz küresi (7), gonad (8) ve ekstremitte oluşumunda (9), erişkinlerde ise kök hücre yenilenmesi (10) süreçlerinde rol oynar. Yolak defektleri sonucunda kanser (Ptch), holoprosensefali, polidaktili (Shh, Gli 2-3, Ptch), trakeaözefagial fistüller (Gli3), siklopami (Shh), gonadal disgenezi (Dhh) görülür (11).

Desert, Indian ve Sonic hedgehog proteinleri (ligandlar) negatif düzenleyici transmembran proteini Patched (Ptch)'a bağlanır ve Ptch inhibisyonu oluşur (12). Normalde pozitif düzenleyici reseptör Smoothed (Smo) üstünde inhibisyonu olan Ptch inhibe olunca Smo aktive olarak sitoplazmada bağlı olan glioma associated oncogen (Gli) transkripsiyon faktörlerinin açığa çıkmasına neden olur. Gli

transkripsiyon faktörleri çekirdeğe transloke olarak hedef gen aktivasyonu yada inhibisyonu sağlar. Yolağın son ürünü olan Gli proteinleri, çinko parmak transkripsiyon faktörlerindendir. Hh yolağının hedef genlerinin promotorunda 9 baz çiftlik sekansı tanıyarak bu bölgelere tutunur (12). Alt çeşitlerinden Gli1 ve Gli2 aktivatör , Gli3 ise supresör olarak görev alır. Hh ligandının yokluğunda, Gli proteinleri Ci-155 kompleksi içerisinde sitoplazmada bulunur. Hh ligand varlığında ise serbest kalarak kompleksten ayrılıp çekirdeğe geçer (11).

Hedgehog sinyal yolağının kanonik yolağından farklı 2 tip kanonik olmayan yolağı da vardır; Tip 1: Ptch1 in Smo ve Gli den bağımsız olarak ligand yokluğunda siklin B1'i bağlayıp apoptoza, ligand varlığında ise inhibe olarak siklin B1'in serbest kalmasını ve hücre proliferasyonunu sağlar (13). Tip 2 kanonik olmayan yolda ise Smo'nun Gli ve Ptch'den bağımsız Gi proteini ile çift oluşturup adiposit ve iskelet kası hücrelerinde aerobik glikoliz, glukoz alımı ve düz endoplazma retikulumundan kalsiyum salınmasına yol açtığı bilinmektedir (14).

Siklopamid SMO inhibitörü olan bir alkaloidtir ve SMO inhibisyonu sonucu yolağın son ürünlerinin ortaya çıkmasını engeller. İlk olarak Veratrum californicum bitkisinden elde edilmiştir. Kemoterapide kullanılmasına dair çalışmalar vardır (15).

Aktif Shh sinyal hedefleri (Ptch, Smo ve Gli1) fare (16), kedigiller (17) ve domuz (18) gibi türlerin granüloza ve kumulus ooforus hücrelerinde tespit edilmiştir. Gli1(+) insan granüloza hücrelerinde Dhh ve Ihh inhibisyonunun folikülogenezi durduğu ve teka hücre gelişimine engel olduğu gösterilmiştir (19). *In vitro* maturasyon deneylerinde Shh proteinin kültür ortamına eklenmesiye domuz oositlerinde PTCH1 protein ekspresyonu gösterilmiş ve oosit maturasyonu ile embriyonel gelişimine etkisi tartışılmıştır (18, 20).

Oksisteroller, steroid sentezinde ara basamak olarak üretilen okside kolesterollerdir (21). Yarı ömürleri kısa ve kararsız moleküller olmasına rağmen, hem steroid sentez yolağında ara basamak olduklarından hem de moleküler hücre yolaklarında aldıkları görevler nedeniyle biyolojik sistemlerde önemli yer tutarlar (22). Yakın zamanda oksisteroller hakkında artan sayıda yapılan çalışmalar, nörodejeneratif hastalıklarda (23), meme kanseri ve invazyonundaki rollerini (24)

ortaya koymuştur. Bunun yanında oksisteroller Hedgehog yolağında, yolak ligandlarının posttranskripsiyonel modifikasyonunda yer alırlar ve yolak reseptörü Smo'nun ekstrasellüler kısmında bir oksisterol bağlanma bölgesi mevcuttur (22, 25).

Dişi genital sistemde yer alan bir oksisterol olan foliküler sıvı-mayoz aktive edici sterol (FF-MAS) preovulatuvar foliküldeki foliküler sıvıdan elde edilmiştir (26). Oositin mayoz II'ye geçişinde etkisi olduğu bilinen FF-MAS aynı zamanda 2 hücreli blastomerden blastokiste geçişte rol alır. İn vitro fare çalışmalarında folikülogenezde, oosit olgunlaşmasında, metafaz 2 geçişinde ve 2 hücreli blastomerin blastokiste ilerlemesine yardım eder (27, 28).

Folikülogenezde; Hedgehog sinyal yolağı ve FF-MAS'in rol aldıkları bilinmektedir ancak Hh yolağı ile FF-MAS'i ilişkilendiren literatür bulunmadığından hangi moleküler mekanizmalar ile etkinlik gösterdiği de bilinmemektedir. Folikülogenezde rol oynayan FF-MAS oksisterolünün etkisinde Hedgehog sinyal yolağı ile etkileşiminin yeri olup olmadığı çalışmamızın esas sorusudur.

Çalışmamızın amacı granüloza hücre proliferasyonunu artıran ve oosit maturasyonuna katkıda bulunan FF-MAS oksisterolünün, folikülogenezdeki etkisinin Hedgehog sinyal yolağı ile muhtemel ilişkisini ortaya koymaktır. Bu amaçla hücre proliferasyon bozukluğu olan PKOS hastalarının folikül sıvılarından ve kontrol grubu olarak erkek infertilitesi nedeniyle IVF tedavisine başvuran sağlıklı kadınlardan elde edilen primer granüloza hücre kùltürleri oluşturuldu. Bu ana gruplarda ve standart kontrol olarak insan normal granüloza hücre hattı HGL5 hücrelerinde, FF-MAS verilen ve verilmeyen alt gruplar arasında Hh yolağı bileşenleri SMO ve Gli1 ekspresyonları karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Ovaryumlar çocuk doğurmamış kadınlarda, yaklaşık 3 cm uzunluğunda, 1.5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığında, bir çift, oval şekilli organlardır. Ergenlikten önce ovaryumların yüzeyi pürüzsüzdür, ancak üreme yaşamı boyunca, tekrarlayan ovülasyonlar nedeniyle aşamalı olarak skarlı ve düzensiz hale gelir. Postmenopozal kadınlarda ovaryumlar, üreme döneminde gözlenen boyutun yaklaşık dörtte biri kadardır (1).

Ovaryumlar, bir korteks ve bir medulladan oluşmaktadır. Ovaryumdan alınan kesitlerde bu iki bölge birbirinden rahatlıkla ayırt edilebilir. Medulla veya medüller bölge ovaryumların orta kısmında bulunur ve gevşek bağ dokusu, daha büyük kıvrımlı kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler içerir. Korteks veya kortikal bölge, medullayı çevreler. Kortekste foliküller, hücreden zengin bir bağ dokusu içerisinde bulunmaktadır. Foliküllerin etrafındaki stromada, yer yer görülen düz kas lifleri bulunmaktadır. Medulla ve korteks arasındaki sınır belirsizdir (1).

Ovaryumlar, mezotelyum ile devam eden yüzey epiteli veya germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik, yer yer yassı epitel ile döşelidir. Günümüzde, primordial germ hücrelerinin (hem erkek hem dişide) vitellus kesesi duvarından, embriyonik gonadın korteksine göç ettikleri, burada farklılaştıkları ve ovaryumun oluşumun yapılanmasına indüktif etkide bulunurlar. Sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea, germinal epitel ile alttaki korteks arasında yer alır (1).

2.1.1. Ovaryumların Embriyonel Gelişimi

Embriyonik dönemin ilk ayında, primordial germ hücre popülasyonu, vitellus kesesi duvarından primordial gonadların gelişeceği alana göç eder. Ovaryum farklanmasının ana belirleyici yolağı Wnt yolağıdır ve Wnt4 bu farklanmada en önemli rolü oynamaktadır. Primitif gonadın korteksi ovaryumlara farklandıktan bir hafta sonra (beşinci hafta) primer seks kordonları oluşmaya başlar. Ovaryumlar geliştikçe, bu germ hücreleri, tamamlanmamış sitokinez ile senkronize mitoz

gösterir ve birkaç milyon birbirine bağlı oogonia ortaya çıkar (29). Bu mitotik aktivite, insanlarda gebeliğin 11-12. haftalarında sona erer ve oogonia kümeleri, ilk mayotik bölünmenin uzun profaz aşamasına girer. Bu hücrelerin çoğu apoptotik hücre ölümüne uğrar. Ancak diğerleri mayozun diğer aşamalarına ilerlemeden, uzun süre ilk mayoz bölünmenin profaz evresine girer, çapraz geçiş (*crossing-over*) tamamlanır ve bu evrede latent olarak kalır. Mayotik duraklamadaki bu hücreler, primordiyal oosit olarak adlandırılır ve her biri, folikül hücresi adı verilen tek katlı yassı epitel benzeri destek hücreleriyle çevrelenir. Primordiyal foliküller ergenliğe kadar değişime uğramazlar. Genellikle her adet döngüsü sırasında, sadece bir oosit mayoz bölünmeye devam eder ve ovülasyon ile ovaryumdan atılır. Bir kadının üreme süreci yaklaşık 30-35 yıl olduğundan, ovülasyon ile ovariumlardan sadece yaklaşık 450 oosit atılır. Diğerleri atrezi yoluyla dejenere olur (29, 30).

2.2. Ovaryum Döngüsü

2.2.1. Foliküllerin Gelişimi

Ovaryum döngüsünün üç aşaması bulunmaktadır: foliküler faz, ovulatuvar faz ve luteal faz. Foliküler faz, birkaç primordiyal folikülün gelişerek, önce primer sonra sekonder ve antral daha sonra Graaf folikülü haline gelmesinden oluşmaktadır. Aralarından en az biri bu süreci tamamlar ve ovülasyon ile atılır (30).

Primordiyal foliküller, sayıca en fazla ve en küçük foliküllerdir, çapları 25 µm kadardır. Bu foliküller, tek katlı yassı granüloza hücresi ile çevrilidir ve bu hücreler hormon sentezi gerçekleştirmezler. Mevcut primordiyal folikül miktarını göstermesi açısından AMH seviyeleri klinikte önemlidir. Granüloza hücreleri ve primer oositler arasındaki ilişki gap junctionlar aracılığı ile sağlanır (30).

Primer foliküller, tek sıra kübik granüloza hücresiyle sarılı oldukları zaman primer unilaminar folikül adı alır ve ovaryum stromasından bazal laminayla ayrılır. Bu bazal lamina ve granüloza hücreleri kan folikül bariyerinin yapısına katılır. Bu evrede oositin etrafında, oositin salgılanan bir tabaka olan zona pellusida görülmeye başlar (31).

Zona pellusida, granüloza hücrelerini primer oositten aşamalı olarak ayıran bir glikoprotein yapısında tabakadır. Zona pellusida ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 glikoproteinlerinden oluşmaktadır. Tek tabakalı granüloza hücreleri FSH'nin uyarısı ile proliferer olur ve çok tabakalı foliküllere dönüşüp primer multilaminar folikülü oluşturur. Granüloza hücreleri aktivin, kemik morfojenik protein-15 (BMP15) ve büyüme-farklanma faktörü-9 (GDF9) gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle proliferer olur. Bu evrede Zona pellusida birleşmeye başlar ve primer oositi granüloza hücrelerinden ayırır. Zona pellusida yapısına, oosit mikrovillusları ve granüloza hücrelerinin ince sitoplazmik uzantıları penetre olarak birlerine bağlanır.

Granüloza hücreleri-oosit temas bölgelerinde, gap junctionlar ile birbirine tutunur, bu bağlantılar moleküler iletişimi sağlar ve primer oositin mayoz bölünmenin profaz aşamasının zamanından önce yada sonra tamamlanmasını önler. Granüloza hücreleri arasında da gap junctionlar görülmektedir. Bu da granüloza hücrelerinin iletişim halinde olduğuna işaret etmektedir. Primer multilaminar folikül geliştikçe, granüloza hücrelerinin ekstrasellüler alana salgıladıkları folikül sıvısıyla dolu alanlar ve yine folikül sıvısına benzer PAS pozitif boyanan Call-Exner cisimcikleri denen sıvı dolu alanlar oluşmaya başlar. Bu şekilde görünen folikül çeşidine sekonder folikül (antral folikül) denir. Call-Exner cisimcikleri hyalüronan ve proteoglikan içermektedir ve folikül sıvısı gibi granüloza hücrelerinden salgılanır. Yine bu cisimcikler granüloza hücre kaynaklı kanserlerde patognomiktir. Folikül sıvısı plazma, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve steroid bağlayan proteinler içermektedir, bunun yanında progesteron, estradiol, inhibin, follikülostatin ile LH ve FSH'nin salgılanmasını düzenleyen aktivin de bulunmaktadır. Sekonder folikülün çapı 200 µm üzerindedir (1, 31).

Sekonder folikülün gelişimi granüloza hücreleri arasında sıvı birikimi ve ovaryum stromasını granüloza hücrelerinden ayıran teka hücrelerinin stromal hücrelerden farklanması ile karakterizedir. Sekonder folikülleri çevreleyen stromal hücrelerden kaynaklanan teka hücreleri, her bir folikülün etrafında iki ayrı tabaka halinde düzenlenir: 1- teka interna ve 2- teka eksterna. Teka hücrelerinin bu organizasyonu hem primer oositin çapının gelişmesi hem de oosit ve granüloza

hücrelerinden salgılanan kit ligand (kök hücre faktörü) sayesinde meydana gelmektedir. Kit ligand salgılandıkça, oositte ve teka hücrelerinde kit ligand reseptörleri eksprese olur ve teka hücrelerinin transformasyona uğramasını sağlar. Teka eksterna, ovaryum stromasıyla devam eden, bağ dokusu kapsülü benzeri bir tabakadır. Bunun aksine, teka interna, gelişen folikülün bazal laminasına bitişik, yüksek miktarda kan damarı içeren tabakadır (31).

Teka internada bulunan hücrelerin zarında LH reseptörleri bulunmaktadır ve bu hücreler steroid salgılayan hücrelere benzer şekilde, ince, uzun, sitoplazmalarında küçük lipid damlacıkları bulunan hücrelerdir. Bu hücreler, bir androjen öncüsü olan androstenedion salgırlar. Androstenedion, testosteron üretimi için bazal laminadan geçerek, granüloza hücrelerine aktarılır. FSH ayrıca granüloza hücre zarında bulunan LH reseptörlerinin eksprese olmasını sağlar. Granüloza hücreleri, androstenedionu testesterona çevirirler (30, 31).

Testosteron daha sonra aromataz tarafından estradiole dönüştürülür. Granüloza hücreleri, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli enzimlere sahip değildir. Sonuç olarak, granüloza hücreleri folikülogenez sırasında tek başlarına steroid öncüllerini üretemez. Granüloza hücreleri, folikülün gerekli büyüklüğe ulaşmadan oositin mayoz bölünmede ilerlemesini engelleyen oosit maturasyon inhibitör b (OMI-b) salgırlar. Granüloza hücreleri arasında foliküler sıvı içeren, küçük boşluklar birleşip geniş bir alan olan antrumu oluşturur (30, 31).

Graaf folikülünde granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve folikül sıvısındaki artış ile çap 2.5 cm'ye çıkar. Antrum oluşumundan kısa süre sonra, Graaf folikülündeki (aynı zamanda preovulatar veya olgun [matür] folikül) granüloza hücreleri primer oosite göre iki bölgeye ayrılırlar: primer oosite yakın kümülüs granüloza hücre bölgesi (*cumulus oophorus*) ve folikül duvarını kaplayan membranöz yada mural granüloza hücre bölgesi. Zona pellusida'ya sıkıca tutunmuş granüloza hücre tabakasına korona radiata adı verilir. Oosit ve etrafındaki korona radiata hücrelerinin oluşturduğu tümsek yapı antruma doğru çıkıntılı şekilde görülür (30, 31).

2.2.2. Folikül Atrezisi veya Dejenerasyonu

Birkaç primer folikül olgunlaşma sürecine başlar, ancak sadece bir folikül gelişimini tamamlar; geri kalanı atrezisi adı verilen apoptotik bir süreçle dejenere olur. Foliküller, gelişimin herhangi bir aşamasında atretik hale gelebilirler. Atretik foliküller, kalın ve katlanmış bir bazal membran, kısmen sağlam bir zona pellusida, dejenere olmuş oosit ve granüloza hücrelerinin kalıntıları ve çok sayıda makrofaj içermesiyle histolojik olarak tanımlanabilir (30).

2.2.3. Ovulatuar Faz

Ovülasyon sırasında, olgun folikül, ovaryum yüzeyinden dışarı çıkıntı yapar bu yapı “stigma” olarak adlandırılır. Teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik aktivite denenen protein yıkım sürecine neden olacak enzim üretimi, LH pikiyle indüklenir. Proteolitik aktivite ile stigmadan dışarıya, olgunlaşmış Graaf folikülünün oosit ve korona radiata hücrelerini içeren kümülüs-oosit kompleksinin atılmasını kolaylaştırır. Serbest bırakılan kompleks, tuba uterinaya girer. Ovülasyondan birkaç saat önce, mural granüloza hücre tabakası ve teka interna, korpus luteuma dönüşmeye başlar (30).

2.2.4. Luteal Faz

Korpus Luteum

Ovulasyonu takiben, mural granüloza hücre tabakası kıvrılıp katlanır ve korpus luteumun (hormon salgılayan) bir parçası haline gelir. Bu dönüşüm şunları içerir:

1. Folikülün bazal laminasının bozulması: teka eksterna ve tunika albugineadan gelen proteolitik enzimler etkisiyle, folikülün ilk tabakası olan bazal lamina yıkıma uğrar.

2. Kan damarlarının folikülün damar içermeyen hücresel kitlesine invazyonu: Kan, antral boşluğa akar ve pıhtılaşarak geçici bir korpus hemorajikum denenen kırmızı

renkli bir kitle oluşturur. Fibrin pıhtısına daha sonra anjiyogenez ile yeni oluşan kan damarları, fibroblastlar ve kollagen fibrilleri penetre olur.

3. Mural granüloza hücreleri ve teka interna hücrelerinin dönüşümü: Mural granüloza hücreleri granüloza lutein hücrelerine dönüşür. Steroid salgılayan hücrelerin tipik özellikleri olan sitoplazmik lipid damlacıkları, iyi gelişmiş düz endoplazma retikulumu ve tübüler kristal mitokondri izlenir. Hem FSH hem de LH stimülasyonuna yanıt olarak progesteron ve östrojen salgılanır. Teka interna hücreleri, LH stimülasyonuna yanıt olarak androstenedion ve progesteron üreten teka lutein hücrelerine dönüşür. Granüloza lutein hücreleri, estradiolün tam sentezi için gerekli olan steroidojenik enzimden hala yoksundur. Teka lutein hücreleri, daha sonra foliküler lutein hücreleri içinde estradiole dönüştürülen androstenedion salgılayarak granüloza hücreleri ile iş birliği yapar. Korpus luteum büyümeye devam eder ve döllenme gerçekleşmediyse ovülasyondan yaklaşık 14 gün sonra gerileme aşamasına girer. İmplantasyon gerçekleşirse, korpus luteum, implante embriyonun trofoblastı tarafından üretilen insan koryonik gonadotropinin (hCG) uyarıcı etkisi altında büyümeye, progesteron ve östrojen üretmeye devam eder (30).

Korpus Albikans

Korpus luteumun gerilemesi ile korpus albikans oluşur. Korpus luteumun dejenere olan luteal hücrelerinin yerini stromal bağ dokusu alır. Korpus albikans ovaryumda kalır; dejenere olan hücreler sonucu boyut olarak küçülür ama asla kaybolmaz (30).

2.3. Folikülogenez Sırasında Primer Oosit-Granüloza Hücre İletişimi

Oosit ve granüloza hücreleri arasında çift yönlü iletişim, folikülogenez sırasında gerçekleşir. Birçok molekül bu hücreler arasındaki iletişimde rol oynar. Zona pellusida, oosit plazma zarının mikrovillusuyla temas eden korona radiata'nın granüloza hücrelerinden kaynaklanan ince sitoplazmik uzantılarla nüfuz eder. Bu hücre-hücre iletişim mekanizması, primer oositin büyümesini ve hücre döngüsü

ilerlemesini koordine eder. Granüloza hücreleri ve primer oosit arasındaki çift yönlü sinyalizasyon şunları içerir:

1. Granüloza hücre-oosit temas bölgelerinde *zonula adherens* ve oluklu bağlantılar (*gap junction*)
2. Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ailesi üyeleri olan (GDF9 ve BMP15) hücreler arası geçişi

Oluklu bağlantılar besin öğelerinin oosit-granüloza hücreleri ve granüloza hücrelerinin kendi aralarında geçişini sağlar. Oosit-granüloza hücreleri arasındaki oluklu bağlantılarda konneksin 37, granüloza hücreleri arasındaki oluklu bağlantılarda ise konneksin 43 görev almaktadır. Konneksin 37'nin genetik bozuklukları oosit gelişiminde (32), 43'ün genetik bozuklukları ise folikül büyümesinde bozukluklara sebep olmaktadır (33). GDF9 ve BMP15, granüloza hücre enerji ve steroidogenez metabolizmalarını düzenler. GDF9 granüloza hücre uzantılarının oluşması ve zona pellusidaya penetre olmasına yardımcı olur (34). Bunların dışında AMH, inhibin ve aktivin yine granüloza hücrelerinden salgılanarak folikülogenezin düzenlenmesinde rol alır. Oosit matürasyon inhibitörü (OMI) ve kök hücre faktörü (kit ligand), granüloza hücresinden üretilen, primer oositi mayoz I profazında tutan proteinlerdir. OMI, ovulasyonda meydana gelecek FSH ve LH pikinden önce primer oositin mayoz I'den çıkmasını önler. Kök hücre faktörü, oosit c-kit reseptörüne bağlanır ve oosit büyümesini ve hayatta kalmasını uyarır. Ovulasyondan hemen önce, oosit birinci mayozu tamamlamak için siklin B-Cdc2 kompleksini üreterek kendi kendini indükler. Bu kompleks maturation promoting factor'ün (MPF) üretimini sağlar; MPF ise çekirdek zarının eriyip birinci mayozun tamamlanmasına yol açar (30).

2.4. Polikistik over sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu, kadınlarda en sık görülen metabolik ve endokrin bir patolojidir ve üreme çağındaki kadınların % 5-10'unu etkilemektedir (35, 36). PKOS ilk olarak 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından hacmi artmış polikistik ovaryumlar ve amenoreden oluşan bir durum olarak tanımlanmıştır (37). İlk

tanımından beri PKOS'un moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak ve tedavi sürecinin daha iyi ele alınması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ayrıca PKOS etyolojisinde genetik ve çevresel faktörler beraberce yer almaktadır (38). PKOS kliniğinde hastalar arasındaki farklılıklar, tanı ve tedavisi ile ilgili olarak halen devam eden tartışmalara neden olmaktadır. Mevcutta bulunan tanı kriterlerinden (Tablo 2.1) en çok kabul gören Rotterdam kriterleri; 2003 yılında, aşağıdaki major kriterlerden en az ikisini gösteren kadınlarda PKOS teşhisi koymak gerektiğini belirtilmiştir:

- Hiperandrojenemi (klinik veya biyokimyasal)
- Oligomenore veya amenore
- Ultrasonda yumurtalık kistlerinin varlığı (2).

Tablo 2.1. PKOS için tanı kriterleri

	1990 ABD Sağlık Bakanlığı (2 kriterin 2'si)	2003 ESHRE/ASRM (Rotterdam) (3 kriterden 2'si)	2006 AE-PCOS derneği (2 kriterden 2'si)	2012 ABD Sağlık Bakanlığı konsensusu
Kriterler	- HA - OA	- HA - OA - PKOM	- HA - Ovaryum fonksiyon bozukluğu (OA, PKOM yada her ikisi)	2003 Rotterdam kriterlerinin kullanılması tavsiye kararının yanında alttaki alt tipler belirlenmiştir: -Fenotip A: HA+OA+PKOM -Fenotip B: HA+OA -Fenotip C: HA+PKOM -Fenotip D: OA+PKOM

HA: Hiperandrojenizm, OA: Oligo – anovulasyon, ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology, ASRM: American Society for Reproductive Medicine, PKOM: polikistik ovaryum morfolojisi (36)

Bunun yanında, mevcut özelliklere ek olarak genellikle infertilite, kardiyovasküler hastalık, metabolik sendrom, tip-2 diyabet ve endometriyal kanser gelişme riskinde artış gibi başka komorbiditeler de bulunmaktadır (35). Dahası, PKOS'lu hamile kadınlarda preeklampsi, abortus, gestasyonel diyabet ve erken doğum gibi gebelik komplikasyonları riskleri de yüksek orandadır (35). Hali hazırda mevcut bilgi yetersizliği, PKOS patofizyolojisinde yer alan mekanizmaları çözmek için sürekli yeni araştırmaları önemli hale getirmektedir. Bu nedenle semptomlarına müdahaleyi ve ilişkin hastalıkların önlenmesi açısından hala açıklanmayan noktaların araştırılması hedeflenmektedir.

2.4.1. PKOS Ayrıcı Tanıları

PKOS için koyulacak tüm tanılar, benzer veya taklit eden bozuklukların sistematik olarak dışlanmasını gerektirmektedir. Ovulatuvar fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, tiroid disfonksiyonu ve hiperprolaktinemi gibi diğer yaygın oligo-anovülasyon sebepleri laboratuvar testleri sonrasında dışlanmalıdır. Androjen fazlalığı bulguları olan hastalarda, 21-hidroksilaz bozukluğu olan klasik olmayan adrenal hiperplazi; bazal 17-hidroksiprogesteron seviyesinin özellikle sabah ölçülmesiyle dışlanmalıdır (39). Hiperandrojenizm açısından Cushing sendromu ve androjen salgılayan neoplazmalar; insülin direnci açısından da şiddetli insülin direnci bozuklukları (örneğin, hiperandrojenik-insülin direnci-akantozis nigrikans [HAIRAN sendromu] veya lipodistrofi sendromları) uygun testlerle dışlanmalıdır (36).

2.4.2. Polikistik Over Morfolojisi

Polikistik over histopatolojik olarak tespit edilebilmesi ile birlikte klinik olarak en çok transvajinal ultrasonografi ile tanı konur. Polikistik over, iki ovaryumdan en az birinin hacminin 10 cm³'ün (veya 10 ml) üstüne çıkması veya artan antral folikül sayısı yani korteksinde 2-9 mm çapında kist görülebilen ovaryumlar şeklinde tanımlanmaktadır. Yüksek frekanslı transvajinal ultrasonografi problemleri kullanarak yapılacak antral folikül sayımında, foliküllerin tam sayısı en az 18 olmalıdır (3).

2.4.3. İlgili Özellikler ve Morbiditeler

Fazla Kilo ve Obezite

Aşırı yağlanma ve vücut kitle indeksindeki artış, PKOS'lu kadınların %30 ila %60'ının obezite gösterdiğini belirten çeşitli raporlar bulunmaktadır (40). Ancak PKOS-obezite ilişkisi PKOS olmayan obez kadınlar göz önüne alındığında, orta derecede kabul edilmelidir yani PKOS-obezite ilişkisi bilindiğinin aksine yüksek oranlı değildir (41).

Metabolik Disfonksiyon

PKOS'lu hastalardan çoğu, vücut kütlesine bağlı olmaksızın kronik insülin direnci göstermektedir (42). Bununla birlikte, insülin direnci olan hastalarda görülen aşırı insülin üretimi, PKOS'lu hastalarda görülmez, bu da göreceli olarak bir pankreas β hücresi fonksiyon bozukluğunu akla getirmektedir. Bu sebeple PKOS'lu hastalar, glukoz intoleransı ve tip 2 diabetes mellitus için yüksek risk altındadır. PKOS hastalarının, tip 2 diabetes mellitusa sahip olma olasılığı, aynı yaştaki kontrol kadınlarına göre beş-yedi kat daha fazladır (43).

Vasküler Disfonksiyon

Vasküler fonksiyon kaybı, insülin direnci, hiperinsülinemi ve kronik subakut enflamasyon sonucu gelişebilmektedir. Bu sebeple, PKOS hastaları; hipertansiyon, serebrovasküler patolojiler ve derin ven trombozu için risk altındadır (43).

Onkolojik patolojiler

PKOS'lu hastalarda endometriyal hiperplazi ve karsinoma riski, kronik oligo-anovülasyon ve hiperinsülineminin kombinasyonu sonucu artış gösterir. Uzun süreli tedavi edilmemiş bu patolojilere sahip PKOS hastalarında özellikle ultrasonografide endometrial kalınlık artmışsa, tedbir amaçlı endometriyal biyopsiler alınır. Bunun yanında bu hastalık grubunda artmış ovaryum kanseri riski de vardır (43).

Duygudurum Bozuklukları ve Yaşam Kalitesi

Hiperandrojenizm ve hiperinsülinizm; PKOS'lu kadınlarda anksiyete ve depresyon riskini artırmaktadır (43, 44) Hastalığın meydana getirdiği obezite ve erkek tipi kıllanma durumları da hastanın özsaygı ve algısını olumsuz yönde etkileyip, psikopatolojik durumların oluşmasına sebebiyet vermektedir (43).

Üreme Komplikasyonları

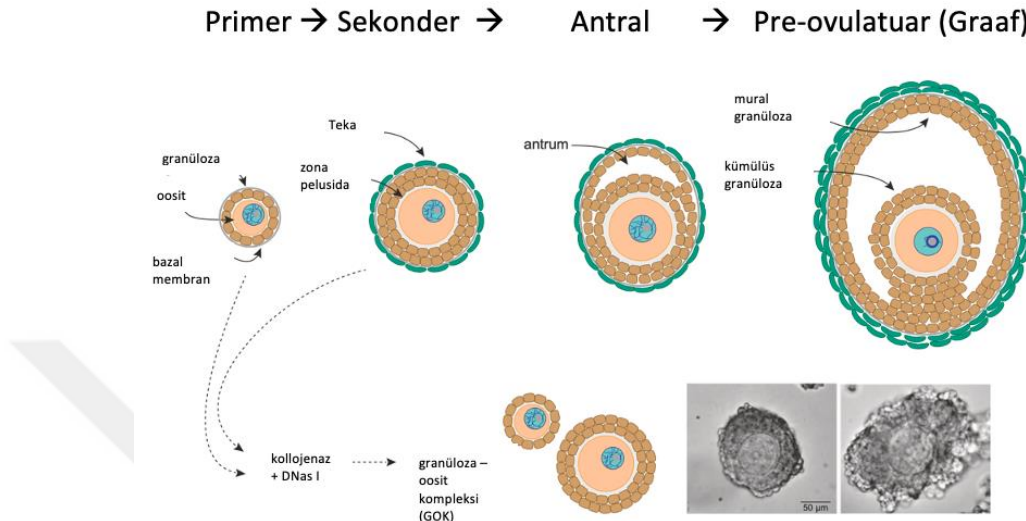
PKOS'lu hastaların çoğu oligo-anovülasyon sonucu üreme problemleri yaşamaktadır (43). Yardımlı üreme tekniği olarak ovulasyon indüksiyon tedavileri kullanılıp anovülasyonun düzeltilmesi, PKOS'lu kadınlar için seçilen tedavi şeklidir. İndüksiyon başarısızlığında aşırı yanıt riski, erkek faktör veya tubal infertilite ihtimali vardır ve bu durumlarda kontrollü ovaryum stümilasyonu + IVF tedavisi düşünülür. Stimülasyondaki bu zorluk androjen fazlalığı ve biyokimyasal yapıdaki değişikliklere bağlıdır (45, 46). Stimülasyon öncesi AMH'nın rolü, uygulanacak stimülasyon protokolleri ve metforminle insülin direncinin kırılması gibi etkenler ele alınır (46).

Gebe kalabilen PKOS'lu kadınlar, gebeliğe bağlı hipertansiyon, gestasyonel diabetes mellitus ve makrozomi gibi çeşitli obstetrik komplikasyonlar için artmış risk altında görünmelerine rağmen, düşükler veya erken gebelik kaybı için anlamlı bir risk artışı mevcut değildir (43, 47).

2.5. *In vitro* oosit ve folikül gelişimi:

Oosit büyümesi sırasında, folikülde aynı zamanda granüloza ve teka hücrelerinin proliferasyonu ve antrum oluşması nedeniyle çap artar. Folikülün anatomik yapısındaki sadelik ve ovaryumlardan tek tek foliküllerin ya da oosit-kümülüs kompleksinin kolaylıkla elde edilmesini sağlar. Bu durumda, folikül ve oositlerin *in vitro* olarak gelişmesine izin veren hücre kültür sistemlerinin kullanılabilmesine olanak sağlar. Bu hücre kültürü sistemlerinde oosit gelişiminin kolayca tespit ve takip edilebilmesi için belirteçler mevcuttur, örneğin oositin boyutu, çekirdek içindeki kromatin düzenlemesi gibi (48, 49) oosit gelişiminin ilerlemesinin kolayca incelenmesine izin verir. *In vitro* oosit gelişiminin son adımı,

yetiştirilen oositin sağlıklı embriyo oluşturup oluşturmayacağını test eder. Ancak bunu test etmek çok nadiren mümkün olmaktadır (Şekil 2.1). Buna rağmen, oosit kültür sistemleri, normal farklılaşmayı tekrarlama kabiliyetinin sağlam ve anlamlı bir şekilde test edilebildiği çok az sayıda hücre kültür sistemlerinden biridir (50).



Şekil 2.1. Kolajenaz ve DNaz I kullanılarak primer veya sekonder foliküllerin hafif enzimatik sindirimi sonucu, teka hücrelerini dıştan saran bazal membran ve tekal hücre tabakası kaldırılarak granuloza-oosit kompleksleri (GOK'lar) ayrıştırılır (50)

Oositleri *in vitro* büyütmek için iki strateji geliştirilmiştir: birincisinde intakt folikül alınır, ikincisinde ise, foliküllerin hafif enzimatik sindirimi sonucu teka hücreleri ve granuloza hücrelerini dıştan saran bazal membranı ayırarak, granuloza-oosit kompleksleri (GOK'lar) çıkarılır (51, 52). Birinci yöntem, oosit "nişinin" fizyolojik yapısını benzer bir şekilde taklit ederken, ikinci yöntemde, GOK'lar alındığından, oosite besin iletimi ile ilgili ortaya çıkabilecek problemler azalmaktadır. Her iki yöntemde de canlı doğan yavrular elde edilmiştir (52, 53). Bununla birlikte, son yıllarda, oosit ve foliküler büyümeyi destekleyen 3 boyutlu matrislerin geliştirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir ve bunların sonucunda *in vitro* matürasyonu sağlanan oositler elde edilebilmiştir (54-56).

2.6. Hedgehog sinyal yolağı:

Hedgehog (Hh) geni ilk drosophila'da tanımlanmıştır. Mutant, hedgehog genleri homozigot olarak negatif olan drosophila larvalarının vücudunda, kalın dikensi kıla benzer çıkıntılar olduğu için, hedgehog (kirpi) olarak isimlendirilmiştir (57-59) .

1994 yılında, omurgalılarda embriyolojik gelişimde rolü olduğu gösterildi ve bilinen en önemli sinyal molekülleri arasında yer aldı (60). Omurgalılarda bu yolağa ait ligandların 3 farklı proteini bulunmaktadır: sonic hedgehog (Shh), desert hedgehog (Dhh), and indian hedgehog (Ihh). Shh, hedgehog sinyal yolağının en iyi çalışılmış ligandıdır. Vertebralılarda organ gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Tablo 2.2) (58).

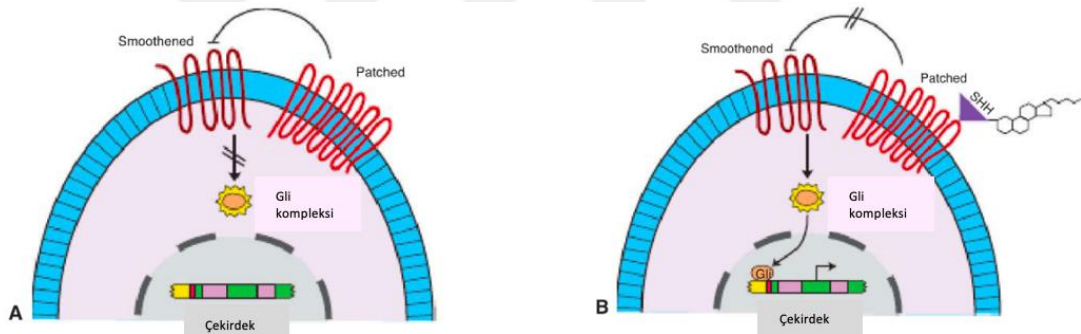
Tablo 2.2. Sonic hodgehog yolağının görev aldığı embriyonel gelişim süreçleri (58).

<i>Sinyal merkezi</i>
Primitif düğüm
Notokord
Sinir sistemi
Sindirim kanalı
Ekstremitte kutuplaşması
Saç ve tüy kökleri
Yüzün ektodermal gelişimi
2. faringeal yayın apikal ektodermi
Akciğer ağacının epitel kök uçları
Retina oluşumu
Genital tüberkülün büyümesi

2.6.1. Sonic Hedgehog: Embriyogenezde Temel Yolak

Moleküler biyolojiden önce, embriyologlar tarafından, tüm embriyonik gelişimi yönlendiren bir ana sinyal yolağının varlığı olduğu düşünülmüştür. Bu sinyal yolağının üyesi olan ve morfojen olarak davranan molekül, farklı konsantrasyon ve lokalizasyonlarda salgılanarak, hücrelerin hangi doku ve organlara farkanacakları konusunda yönlendirdiği varsayılmıştır. Günümüzde embriyonik gelişimi koordine ederek düzenleyen çok sayıda sinyal molekülü olduğu bilinse de, hedgehog proteininin hepsinin ana düzenleyicisi olmaya en yakın olanıdır (59).

Hedgehog yolağı damar gelişimi, sol-sağ eksen oluşumu, orta hat oluşumu, beyincik, sinir sistemi, ekstremiteler, düz kas, kalp, bağırsak, farenks, akciğerler, pankreas, böbrekler, mesane, kıl folikülleri, dişler, iç kulak, gözler, tat tomurcukları ve timositlerin gelişiminde rol oynar ve çok sayıda farklı gelişim sürecini etkiler (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sonic hedgehog [Shh] sinyal yolağı; A. Patched proteini Smoothened'i inhibe eder. Böylece Shh sinyalini ileten GLI proteinlerinin aktivasyonunu bloke olur. B. Shh'un Patched reseptörüne bağlanması, Patched'in Smoothened üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırır. Smoothened'in aktivasyonu daha sonra DNA'ya bağlanan ve Shh yolağındaki efektör genleri kontrol eden GLI transkripsiyon faktörlerini *upregüle* eder (59).

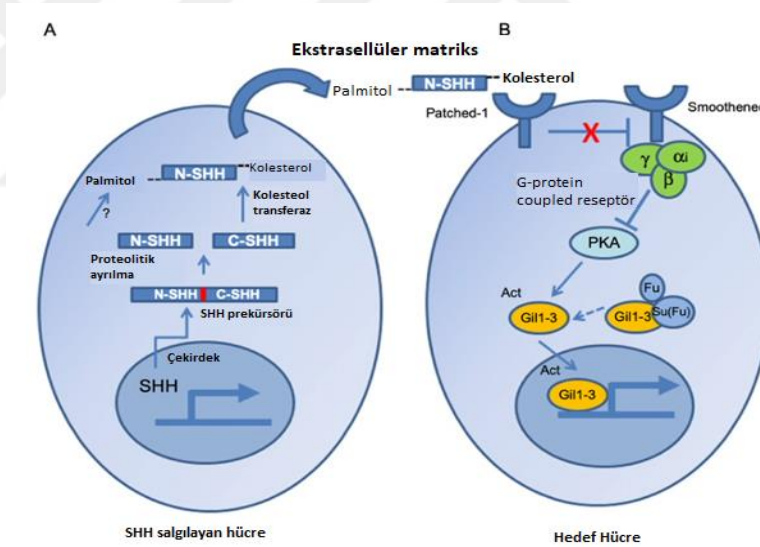
2.6.2. Hedgehog Sinyal Yolağının Çalışması

Hedgehog Ligandının Sentezlenmesi

Hedgehog yolağı otokrin ve parakrin olarak etki göstermektedir. Efektör hücre hem kendi hem de komşu hücrelere, ligand sentezleyerek etki gösterebilir. Yolağın ligandları (Shh 7. kromozomdan, Dhh 12. Kromozomdan, Ihh 2.

Kromozomdan) transkripte edildikten sonra , enzimlerle proteolitik olarak parçalanır. Sonic hedgehog için; oluşan parçalardan biri, tüm sinyal aktivitelerine aracılık eden 19kDa N-terminal proteini (N-SHH), diğeri, proteaz aktivitesine sahip 25kDa C-terminal proteinidir (C-SHH) (61).

Hedgehog proteininin N-terminal alanının karboksi ucuna, kolesterol ve kolesterol türevlerinin bu aşamada kovalent bağlanması indüklenir. Kolesterol parçasının, salgı yapan hücredeki hedgehog protein trafiğini yönlendirdiği düşünülmektedir. N-terminal alanı, bilinen tüm sinyalleşme özelliğini muhafaza ederken, C-terminal alanı, bir kolesterol transferaz olarak hareket eder. Bunun yanında hedgehog ligand proteinlerinin hücre zarına ve oradan ekstrasellüler matrikse çıkışında lipid raft ve kolesterol ilişkisi bulunur (62). Kolesterol bağlanması, Hh yolağının faaliyetleri için gereklidir. Bu durum, yolağın steroidogenezle bağlantısına işaret etmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Sonic hedgehog ligandının salgılayan hücreden sentezi, postranskripsiyonel modifikasyonu ve hücre dışına verilmesi. Süreçte kolesterolün aldığı rol, görülmektedir (12)

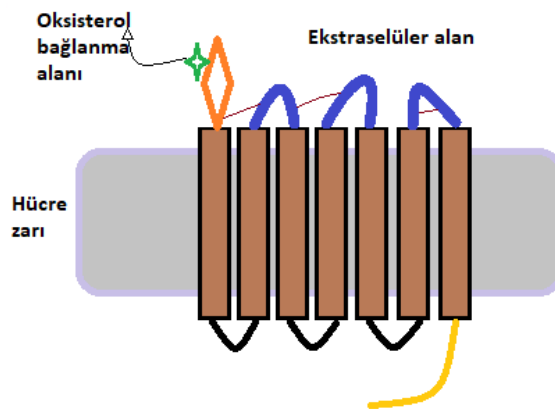
Patched reseptörü

Ligandlar efektör hücreden salındıktan sonra hücre zarında bulunan patched (Ptch) reseptörüne bağlanır. Ptch hücre membranını 12 kere geçen transmembran proteindir. Geni, dokuzuncu kromozomun q kolu üzerinde bulunmaktadır.

Drosophiladan memelilere kadar geni korunmuştur. Ligand bağlandığı zaman endositozla hücre içine alınmaktadır (63). Ptch, hedgehog yolağının negatif regülatörüdür, yani ligand bağlanmadığı zaman, yolağın smoothed (Smo) isimli reseptörü üstünde baskılayıcı etkisi vardır. Ligand bağlanıp hücre içine alınınca Smo üzerindeki etkisi ortadan kalkar (64).

Smoothened reseptörü

Yolağın efektör proteini yani pozitif düzenleyicisidir. Smoothened bir G-coupled reseptörü olup, membranı 7 kere geçen transmembran protein yapısındadır. Geni, yedinci kromozomun q kolu üzerinde bulunmaktadır Ptch'ın inhibisyonu Ptch'ye ligand bağlanıp üstünden kalkınca, konformasyonel değişim gösterir (65). Bu değişim sonucu sitoplazmada bulunan protein kompleks yapısındaki Ci-155'in alt birimlere ayrılmasını sağlar. Böylece yolağın son ürünleri olan glioma associated proteinleri (Gli) açığa çıkar. Ci-155 proteinin alt birimlere ayrılmasını Smo, G coupled reseptör kinaz 2/3'ü (GRK2/3) uyararak sağlar (66). Smo proteinin hücre dışında bulunan kısmında sistinden zengin parçasında (CRD) oksisterol bağlanma alanı bulunmaktadır. Bu alana kolesterol ara ürünleri olan oksisteroller bağlanarak Smo'da konformasyonel değişimlere neden olduğu ve böylece aktive olmasını sağlar (66, 67). Hh ligandlarının posttranskripsiyonel modifikasyonundaki rolü ve Smo üstündeki etkisi, oksisterollerle Hh yolağının ilişkisine dair dikkat çekmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Smoothened proteini ve hücre dışındaki kısmındaki oksisterol bağlanma bölgesi

Glioma ilişkili protein (Gli) ve tipleri

Hedgehog yolağının son ürünü *glioma associated oncogen* proteini (Gli) dir. Gli proteini çinko parmak (Zn^{++} finger) transkripsiyon faktörlerindendir. Bilinen 3 alt tipi bulunmaktadır:

- 1- Gli1: Geni 12. kromozomun q kolu 13.3 lokusunda bulunmaktadır ve aktivatör bir transkripsiyon faktörüdür.
- 2- Gli2: Geni 2. kromozomun q kolu 14.2 lokusunda bulunmaktadır ve aktivatör bir transkripsiyon faktörüdür.
- 3- Gli3: Geni 7. kromozomun p kolu 14.1 lokusunda bulunmaktadır ve inhibitör bir transkripsiyon faktörüdür.

Bu transkripsiyon faktörlerinden, Gli1 en çok bilinen ve en çok etkinliği araştırılanıdır. Hh ligandları varlığında sitozolde bulunan protein kompleksinden ayrılıp serbestleşir. Daha sonra nükleer por komplekslerinden importin $\alpha 3$ ile geçerek çekirdeğe geçer. İmportinler özgün proteinlerle bağlantılar kurarak, bu proteinlerin çekirdeğe girmesini sağlayan moleküllerdir (68). Gli1, Hh yolağının hedef genlerinin promotorunda 9 baz çiftlik sekansı tanır ve tutunur. Wnt, BMP'ler, siklin D ve E, yolağın kendi bileşenlerinin genleri, transkripsiyon faktörlerinin hedef genleridir.

2.6.3. Hedgehog Yolağı Inhibitörü Olarak Siklopamin

Bir alkaloid olan siklopamin, 1954'te siklopamin içeren bitkileri (*veratrum californicum*-mısır zambacı) tüketen hamile koyunların yavrularının karaniyofasiyal defektlerle, özellikle tek gözlülükle (siklopami) doğmaları sonucu yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır ve adını da sebep olduğu patolojiden almıştır (69). *Veratrum californicum* bitkisi ekstraktından elde edilen siklopamin Smo'ya bağlanarak inhibe etmektedir. Bunun sonucunda Smo aktivitesi ortadan kalkar ve Hh yolağı inhibe olur (15).

Siklopaminin Hh yolağını inhibisyon özelliğinden faydalanılıp, kanser tedavisinde kullanılması ile ilgili çalışmalar vardır (7). Bazal hücreli karsinoma, kolon, özefagus, pankreas, meme, mide, prostat, safra yolları, mesane, ovaryum, karaciğer,

küçük hücreli akciğer ve ağız kanserleri, glioma, miyeloma ve lösemi tedavilerinde siklopamin çalışılmıştır (70-73).

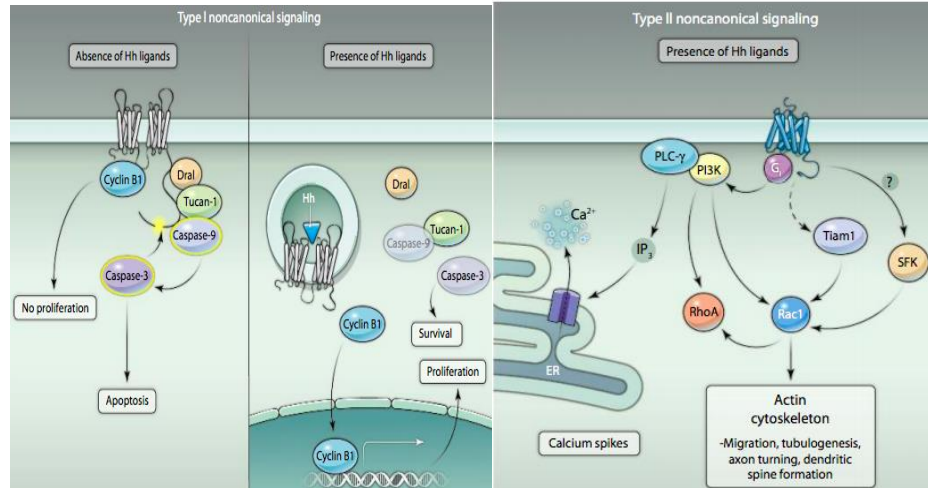
2.6.4. Hedgehog sinyal yolağının kanonik olmayan yolları

Hedgehog sinyal yolağının üstte anlatılan kanonik olan şekinden farklı iki adet kanonik olmayan yolu vardır. Bunlardan ilkinde Ptch reseptörü, Smo ve Gli proteinlerinden bağımsız olarak aktivite gösterir. Ptch ligand yokluğunda siklin B1'i bağlayarak kaspaz 9 ve kaspaz 3'ü uyararak hücreyi apoptoza götürür. Ligand varlığında ise siklin B1, Ptch endositozla hücre içine alındığından serbest kalır ve hücre proliferasyona gider.

İkinci çeşidinde ise Smo, Gli proteinlerinden bağımsız olarak çalışır. Ligand varlığında Ptch'nin Smo üstündeki inhibisyonu ortadan kalkınca özel bir protein ailesi olan inhibitör G proteinleri (Gi) ile çift oluşturur. Bu etkileşim sonucu da iki etki ortaya çıkar:

- 1- Gi proteini fosfolipaz c gama yı (PLC- γ) aktive ederek inozitol 3 fosfat (IP₃) üretimine neden olur. Böylece de düz endoplazma retikulumundan kalsiyum iyonu (Ca⁺) salınımı gerçekleşir.
- 2- Gi proteini T-lenfoma invazyon and metastaz 1 (Tiam1) proteini ve Src ailesi kinaz (SFK) enzimi üzerinden aktin hücre iskeletinin değişim gösterip; migrasyon, tübül oluşumu, akson pozisyon değişimi ve dendritik diken formasyonunun oluşumuna sebep olmaktadır.

Bu iki etki sonuç olarak birbirine bağlıdır. Ca⁺ salınımı, ikinci etkinin sonuçları, özellikle migrasyon için gereklidir (Şekil 2.5)(11, 14).



Şekil 2.5. Hedgehog yolağının kanonik olmayan yolları: solda tip 1, sağda tip 2 (14)

2.7. Oksisteroller

Oksisteroller steroid metabolizmasında ara ürün olarak bulunan, kolesterol veya kolesterol öncülü moleküllerin okside halleridir (22, 25). Beyinde bulunan başlıca kolesterol metaboliti serebrosterol (24S-hidroksikolesterol [24S-HC]), D3 vitamininin biyolojik olarak aktif formu (1 α ,25-dihidroksivitamin D3), makrofajlarda bakteriyel veya viral enfeksiyon sonucu ortaya çıkan 25-hidroksikolesterol, steroid hormon biyosentez yolağında kolesterolün ilk ara ürünü olan 22R-hidroksikolesterol (22R-HC), safra asidi biyosentezinin ilk ürünleri olan 7 α -hidroksikolesterol (7 α -HC) ve (25R) 26-hidroksikolesterol en çok bilinen ve çalışılan oksisterollerdir (Tablo 2.3) (74-78).

Tablo 2.3. En bilinen oksisteroller, kısaltmaları ile ilişkin oldukları metabolik durum ve patolojiler

Bilinen ismi	Kısaltması	İlişki	Kaynak
7-Dehidrodesmosterol	7-DHD	Vitamin D3	(79)
Desmosterol	Des	Steroid sentezi	(80)
7-Dehidrokolesterol	7-DHC	Karaciğer, beyin, adrenal bez	(81)
Latosterol	Lath	Adipozitler, adrenal bez, safra	(82)
Kolesterol	C	Karaciğer, adrenal bez	(81)
3β,7β-Dihidroksikol-5-enoik asit	3β,7β-diH-Δ ⁵ -BA	Safra yolları	(83)
4,4-Dimetil-5α-kolesta-8,14,24-trien-3β-ol	FF-MAS	Dişi genital sistem	(84), (85)
4,4-Dimetil-5α-kolest-8,24-diene-3β-ol	T-MAS	Erkek genital sistem	(25), (84)
7-Oksokolesterol (7-Ketokolesterol)	7-OC	Ateroskleroz, nekroz	(86)
24S,25-Epoksikolesterol (Kolesterol-24S,25-epoksit)	24S,25-EC	Kolesterol sentezi	(87)
5,6-Epoksikolesterol (Kolesterol-5,6- epoksit)	5,6-EC	Ateroskleroz, meme kanseri	(88)
7α-Hidroksikolesterol	7α-HC	Kan serum lipoproteinleri	(89)
7β- Hidroksikolesterol	7β-HC	Multipl skleroz, kolorektal kanser	(89)
22R- Hidroksikolesterol	22R-HC	Alzheimer hastalığı	(90)
24R- Hidroksikolesterol	24R-HC	Myelin kılıf	(91)
24S- Hidroksikolesterol	24S-HC	Safra, serebrotendinöz ksantomatozis	(83)
25- Hidroksikolesterol	25-HC	Safra tuzu, steroid sentezi	(83)
(25R)26- Hidroksikolesterol (27- Hidroksikolesterol)	26-HC	Beyin, fibroblast, nöron	(92)
3β- Hidroksikolest-5-en-(25R)26-oik asit	3β-HCA	Spastik parpleji tip 5, ALS	(93)
(25R)26-Hidroksi-7-oksokolesterol (27-Hidroksi-7-oksokolesterol, 7-keto-27-hidroksikolesterol)	26H,7O-C	Smo - Hh ilişkisi	(94), (95)
7α,25-Dihidroksikolesterol	7α,25-diHC	Gi protein aktivasyonu	(96)
7α,(25R)26- Dihidroksikolesterol (7α,27-Dihidroksikolesterol)	7α,26-diHC	Zellweger sendromu, 27-hidroksilaz bozukluğu, konjenital safra asit sentez bozukluğu tip12	(97)
7β,(25R)26- Dihidroksikolesterol (7β,27-Dihidroksikolesterol)	7β,26-diHC	B lenfosit migrasyonu	(96)
3β-Hidroksi-5-okso-5,6-sekokolestan-6-al	Ateronal A	Liver-X reseptör ilişkisi	(98)
3β,5β-Dihidroksi-B-norkolestan-6β-karboksaldehit	Ateronal B	Ateroskleroz	(99)
Lanosterol	Lan	CHILD sendromu, hiper IgD sendromu	(100)

2.7.1. Oksisteroller ve İlişkili Patolojiler

Oksisteroller gaz kromatografi-mass spektrometri (GC–MS) veya sıvı kromatografi tandem-mass spektrometri (LC–MS/MS) ile kantitatif olarak ölçülebilir. Yarı ömürleri kısadır ancak birçok metabolik olayda ve patolojide rol oynar. Amiotrofik lateral sklerozis (ALS) de 26-HC ve 3 β -hidroksikolest-5-en-(25R)26-oik asit (3 β -HCA) seviyeleri düşmektedir(101), herediter spastik parapleji tip 5 (SPG5)'de 7 α -hidroksilaz düşerken 26-HC ve 3 β -HCA yükselmektedir (102, 103). Yine Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının patogeneğinde oksisterollerin rolü bulunmaktadır (104, 105). 25-HC, 26-HC ve 5,6-epoksikolesterol (5,6-EC)'ün meme kanseri etyolojisinde hem baskılama yönünde hem de uyarıcı yönde etkileri mevcuttur (84, 106).

2.7.2. Mayoz aktive edici oksisteroller: FF-MAS

Byskov A.G. ve ark. boğa testisinden testiküler mayoz aktive edici sterol (T-MAS) isimli oksisterolü izole etmişlerdir. Aynı araştırmacılar 1998 yılında yayınladıkları yayında insan Graaf foliküllerinin folikül sıvısından daha önce tespit edilmemiş bir oksisterol izole edip (4,4-dimetil-5 α -kolest-8,14,24-triene-3 β -ol) adını sıvı-mayoz aktive edici sterol (FF-MAS) olarak belirlemişlerdir (85, 107). İn vitro olarak FSH ile stimüle edilen GOK'larda kümülüs hücrelerinin FF-MAS üretirler, ve FF-MAS oositin mayozu devam etmesini sağlar (27). İn vitro fare oosit olgunlaşmasında metafaz 2'ye geçişte ve 2 hücreli blastomerden blastokiste ilerlemede rol alır (28, 85). Ancak FF-MAS'ın insan oositlerindeki bu etkisinin hangi hücresel yolağı kullanarak gerçekleştirdiğine dair literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Domuz oositlerinde yapılan bir çalışmada FF-MAS oluşumunu engelleyen ve uyaran kristalinler kullanılarak FF-MAS artışı görülen gruplarda MAPK yolağı bileşenlerinin arttığı gözlenmiştir (108).

Hipotezimiz; FF-MAS'ın ovarial siklusta folikülogenez sırasındaki etkisinin, hücre proliferasyonunda yer alan sinyal yollarından biri olan Hedgehog sinyal yolağı ile ilişkili olabilir. Bu hipotez altında primer PKOS granüloza hücrelerinde Hedgehog sinyal yolağı bileşenlerinden Gli1 ve SMO protein üretimi var mı? Varsa

sağlıklı folikül hücrelerindeki ekspresyon ile farklılık gösteriyor mu?, PKOS hastalarından elde edilen primer folikül hücrelerinde, kültür ortamına eklenen FF-MAS ile bu proteinlerin ifadesi değişir mi? ve yolak inhibitörü siklopamin verilmesi ile FF-MAS'ın folikül hücreleri üzerindeki etkisi değişir mi? sorularını cevaplamaya çalışılmıştır.

Amacımız ise FF-MAS'ın granüloza hücre proliferasyonundaki rolünü ortaya koymaktır ve folikülogenez bozukluğu görülen PKOS hastalığında yeterli proliferasyon olmayan granüloza hücrelerinde Hedgehog sinyal yolağı bileşenleri SMO ve transkripsiyon faktörü Gli1 ile ilişkisini değerlendirerek yeni bilgilere ulaşmaktır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

"FF-MAS Oksisterolünün Folikülenezdeki Rolünün ve Hedgehog Sinyal Yolağıyla İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması, 12.06.2018 tarihinde, 2018/15 numaralı toplantıda, 16969557 sayı ve GO 18/573-04 kayıt numarasıyla Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından gerçekleştirilen değerlendirme sonrası etik açıdan uygun bulunmuştur.

Tez çalışması, *in vitro* koşullarda deney (PKOS hastalarına ait örnekler) ve kontrol (sağlıklı kadınlara ait örnekler) gruplarını içerecek şekilde prospektif (ileriye yönelik) gözlemsel ve girişimsel olmayan bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Bağımlı değişkenler alt gruplarken, bağımsız değişkenler ise ana grup elemanlarıdır.

3.1.1. Hasta gruplarının belirlenmesi:

Çalışma kapsamında FF-MAS oksisterolünün folikülogenezdeki etkisi ve Hedgehog sinyal yolağıyla ilişkisi, insandan elde edilen granüloza hücrelerinin primer kültüründe ve insan granüloza hücre hattında çalışılmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na çocuk sahibi olmak için başvuran ve tüp bebek merkezinde takibi yapılan hastalardan, kontrol grubu amacıyla erkek infertilitesi sebebiyle başvuran 8 kadın ve PKOS tanısı nedeniyle başvuran 8 kadından OPU (ovum pick up) yapılması sırasında elde edilen follikül sıvıları kullanılmıştır. Ultrasonda çoklu kistik folikülleri seyredilen, yüksek androjen hormon seviyeleri ve insülin direnci bulunan, ancak tüp bebek tedavi sürecinde kistleri bulunmayan, foliküler gelişim izlenmiş PKOS hastaları dahil edilmiştir. Çalışmaya ultrasonografi eşliğinde ölçülen, 18-20 mm arasında çapları olan foliküllerin sıvıları dahil edilirken, ek hastalığı olan katılımcılar çalışmaya dahil edilmemiştir. Folikül sıvılarından oosit-kumulus kompleksi seçilip kullanılacak oositler ayrıldıktan sonra arda kalan, kullanılmayacak olan granüloza hücresi içeren atık follikül sıvıları EDTA'lı tüplere alınarak HÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim

Dalı'na getirildi. Bu sıvılardan granüloza hücreleri, hücre kültürü laboratuvarında separasyon solüsyonu ile izole edildi.

HÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında izole edilen her bir bireye ait granüloza hücreleri ile primer hücre kültürü kuruldu. Ardından, ticari olarak satın alınan HGL5 insan granüloza hücre hattı çözülerek, üretici firmanın talimatlarına göre hücreler uygun koşullarda çoğaltıldı.

3.1.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Granüloza hücreleri, çalışmanın tamamında yer alan tüm iş paketlerinde kullanılmaya yetecek miktarlarda çoğaltıldıktan sonra, PKOS hastalarından ve erkek faktör (kontrol) hastalarından elde edilen hücreler, ve HGL5 hücre hattına ait olan hücreler birbirlerinden ayrı olarak dört grup halinde çalışıldı (Tablo 3.1):

Grup 1: Sadece FF-MAS verilen grup (FF-MAS grubu),

Grup 2: FF-MAS ve siklopamin verilen grup (FF-MAS + siklopamin grubu),

Grup 3: Sadece siklopamin verilen grup (siklopamin grubu) ve

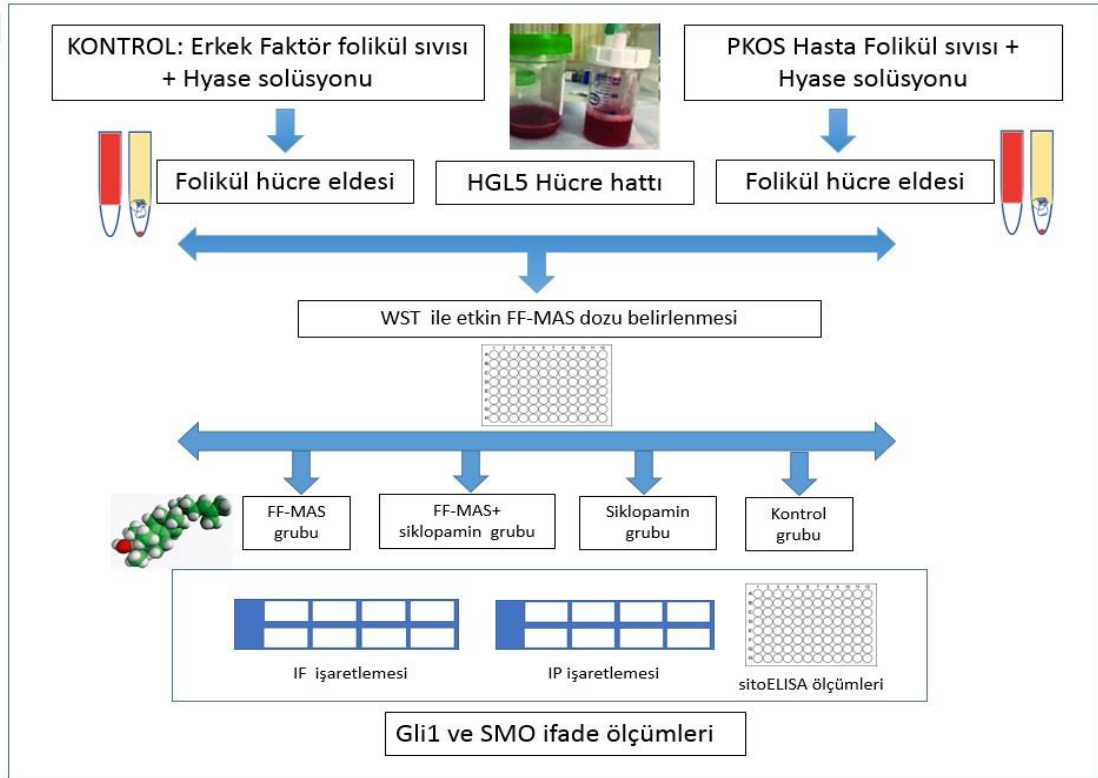
Grup 4: Sadece FF-MAS ve siklopaminin çözücülerinin verildiği grup (kontrol grubu).

Tablo 3.1. Deney gruplarının dağılımı

	DMEM-F12 besiyeri	FF-MAS (ED50)	Siklopamin (10 μM)	Çözücüler
Grup 1 (FF-MAS)	+	+	-	Absolü etanol (1 μl/100 μl)
Grup 2 (FF-MAS+ siklopamin)	+	+	+	Absolü etanol (1 μl/100 μl) + DMSO (0,082 μl/100 μl)
Grup 3 (Siklopamin)	+	-	+	DMSO (0,082 μl/100 μl)
Grup 4 (Kontrol -sadece çözücü içeren)	+	-	-	Absolü etanol (1 μl/100 μl) + DMSO (0,082 μl/100 μl)

3.1.3. Deney Planı

FF-MAS dozunu (ED50 dozu) belirlemek amacıyla iş paketlerindeki deneylere başlamadan önce en yüksek ve öldürücü olmayan FF-MAS dozunu hücrelere farklı dozlar verilerek WST-1 yöntemi ile belirlendi. Bunun için kültüre edilen granüloza hücreleri 96 kuyulu plaklara ekilerek FF-MAS'in farklı dozları granüloza hücrelerine uygulandı. Hücre proliferasyonu 24, 48 ve 72 saatlik WST-1 testi ile değerlendirildi. ED50 dozu belirlendikten sonra her bir katılımcı ve hücre hattı hücrelerindeki SMO ve Gli1 ekspresyonu değerlendirilmeleri immunofloresan, immünperoksidaz işaretleme ve sitoELIZA deneyi ile gerçekleştirildi (Şekil 3.1).

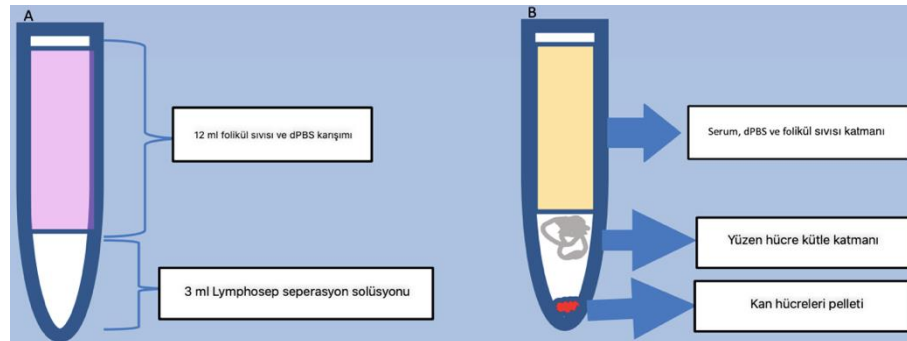


Şekil 3.1. Deney planı

3.2. Yöntem

3.2.1. Granüloza Hücre İzolasyon Yöntemi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi'ne çocuk sahibi olmak için başvuran çiftlerden erkek infertilitesi nedeniyle Haziran 2018'den Temmuz 2020'ye kadar, başvuran 8 kadından ve PKOS sebebiyle başvuran 8 kadının örnekleri çalışmaya dahil edildi. Katılımcılardan OPU işlemi sırasında elde edilen, granüloza hücrelerini de içeren folikül sıvıları (FS) ve işlem sırasında hastanın hiyalüronidaz uygulamasında oosit toplanması sonrası geriye kalan sıvıları kullanılmıştır. FS'ler hızla EDTA'lı tüpler içerisinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarına getirildikten sonra steril laminar akım kabini içerisinde, steril dPBS (PBS-1A, Capricorn Scientific, Almanya) çözeltisi ile 1:1 oranında hücre kaybını minimize etmek için seyreltili. FS'de bulunan eritrosit, lenfositlerin ayrılmasında Lymphosep (L0560, biowest, Fransa) solüsyonu ile izole edildi. Lymphosep'den başka, Histopaque®-1077 ve Ficoll® PM 400 solüsyonları da denendi. Solüsyon 15 cc'lik santrifüj tüpünün dibine 3 cc olacak şekilde konuldu. Solüsyonla karışmasını önlemek amacı ile tüp eğilerek ve çeperine damla damla dökülerek 12 cc folikül sıvısı + dPBS çözeltisi üzerine eklendi. Yavaş eklenmesine dikkat edildiğinden separasyon solüsyonu ve folikül sıvısı + dPBS çözeltisi arasındaki faz gözlemlendi (Şekil 3.2 A). Solüsyonların karışmaması sağlanarak taşınan örnekler, santrifüjde (NF 800R, Nüve, Türkiye) +4°C'de 600 g (2500 rpm) de 30 dakika çevrildi.



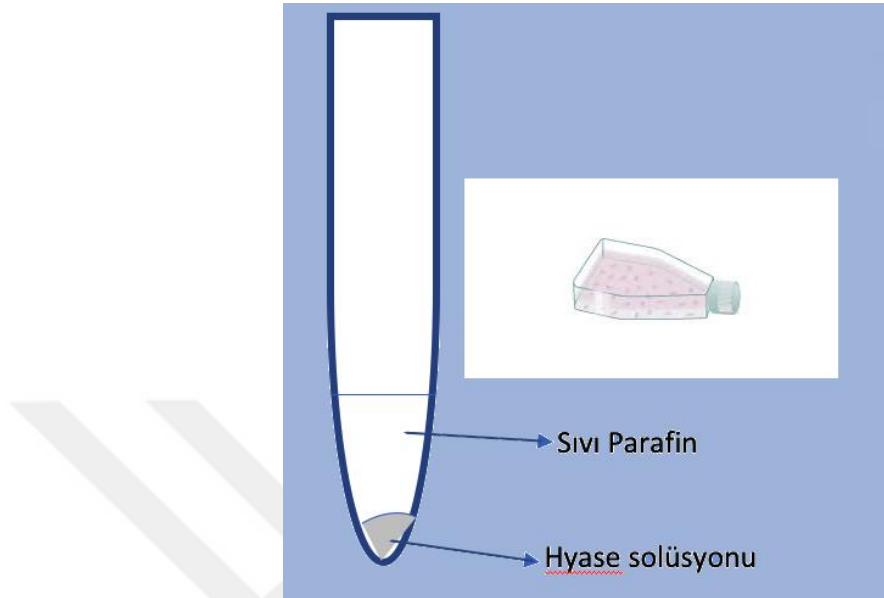
Şekil 3.2. Folikül sıvısından granüloza hücre izolasyonu: A: Santrifüj öncesi tüp görünümü, B: Santrifüj sonrası tüp görünümü

Santrifüj edildikten sonra, en altta kan hücrelerinin bulunduğu kırmızı bir pellet, onun üstünde separasyon solüsyonu ve onun üstünde ise serum, dPBS ve folikül sıvısının bulunduğu bir faz oluşmaktadır. Oluşan iki sıvı faz arasında asılı halde, gözle görülebilen gri-beyaz renkli bulut halinde granüloza hücrelerini içeren bir katman izlendi. Sadece bu katmanı alacak şekilde, 5 ml'lik serolojik pipet ve pipetör (OmniPET, Cleaver Scientific Ltd, İngiltere) yardımıyla her tüpten 4 mL çekilip yeni bir 15 cc'lik santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine aynı miktarda bazal DMEM-F12 (DMEM-12-HXA, Capricorn Scientific, Almanya) besiyeri eklenip çalkalayıcıda (Thermolyne Maxi Mix II Vortex Mixer, Barnstead, ABD) karıştırıldıktan sonra, 5 dakika 1200 rpm (260 g) de çevrildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp kalan pellet komple DMEM-F12 besiyeri ile çözülerek flasklara ekildi. Ekilecek T25 flasklara (83.3910.002, Sarsted, Almanya) (P₀) 1:1 oranında komple DMEM-F12 ve tutunmayı artırmak için komple BioAMF (BIOAMF-1 bazal medyum ((BIO1-190-1A, 450 ml) ve supplement (BIO1-190-1E, 50 ml, Biological Industries, ABD) besiyerleri kullanılarak ekim yapıldı. Sonrasında yapılan pasajlamalarda sadece komple DMEM-F12 kullanıldı (Şekil 3.2 B). Flaskların besiyeri iki günde bir değiştirildi.

3.2.2. Hiyalüronidaz Solüsyonundan Granüloza Hücre İzolasyon Yöntemi

Oosit ve korona radiatadaki hücreleri içeren kümeler folikül sıvısından toplandıktan sonra, oosit-kümülüs kompleksi hiyalüronidaz içeren Hyase (Vitrolife, İsveç) solüsyonu ile denüdasasyona uğratıldı. Granüloza hücrelerinden ayrılan oositler işlem için alındıktan sonra geriye kalan granüloza hücreleri çalışmaya dahil edildi. Çalışma için granüloza hücre içeren solüsyon ve hava ile temasını engelleyen sıvı parafin ayrı bir steril tüpe alınıp hızlıca kültür laboratuvarına getirildi. En altta kalan, sıvı parafinden daha bulanık görünümdeki hyase solüsyonu 100 µl'lik pipet yardımıyla sıvı parafin alınmamasına dikkat edilerek toplandı. Steril 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerine 3 ml komple DMEM-F12 besiyeri eklendi. Sonrasında 5 dakika 1200 rpm (260 G) de çevrildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet 1 ml komple DMEM-F12 besiyeri ile çözülerek flasklara ekildi (Şekil 3.3). Ekilecek T25

flasklara ilk ekimde (P_0) 1:1 oranında komplet DMEM-F12 ve komplet BioAMF kullanıldı. Sonrasında yapılan pasajlamalarda sadece komplet DMEM-F12 kullanıldı. Flaskların besiyeri iki günde bir değiştirildi.



Şekil 3.3. Hiyalüronidaz solüsyonundan hücre izolasyonu

3.2.3. Besiyeri Hazırlama

Komplet DMEM-F12 besiyeri hazırlama

Fetal bovine serumu (FBS) (FBS-11B, Capricorn Scientific, Almanya) 0,8 μ m çaplı filtreden geçirildikten sonra %5 oranında bazal DMEM-F12 (w/o L-glutamin) içerisine eklendi. Sonrasında penisilin-streptomisin %1 (PS-B, Capricorn Scientific, Almanya) oranında ve L-glutamin %4 (GLN-B, Capricorn Scientific, Almanya) oranında eklendi. Bu şekilde 50 ml'lik tüplere, 45 ml bazal DMEM-F12', 2,5 ml FBS, 0,5 ml penisilin-streptomisin ve 2 ml L-glutamin eklenerek 50 ml komplet DMEM-F12 besiyeri hazırlandı.

BIOAMF besiyeri hazırlama

BIOAMF-1 bazal medyum (BI01-190-1A, 450 ml) ve supplement (BI01-190-1E, 50 ml) birbirlerine karıştırıldıktan sonra %1 oranında penisilin-streptomisin eklenerek komplet BIOAMF-1 besiyeri hazırlandı.

3.2.4. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü

İnsan granüloza hücrelerinden oluşan HGL5 hücre hattı (T0650, abm, Kanada) satın alındı. Soğuk zincir bozulmadan laboratuvara ulaştırıldıktan sonra hücre hattı, hücre kültürü laboratuvarı içinde steril şartlar altında laminar akım kabini içinde çözüldü. Çözülen granüloza hücre hattına ait hücreler uygun besiyeri [2% Cosmic Calf Serum (HyClone SH30087.02, GE, ABD), 2% Ultrosor G (SH30087.02, Pall Corporation, ABD), 1% ITS plus (ITS-20, ZenBio, ABD) ve %1 Penisilin/Streptomisin (G255, ABM, Kanada) ilave edilmiş Prigrow IV medium (TM004, abm, Kanada)] içinde 25 cm² lik flasklara (G299, abm, Kanada) ekilip 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün ve izleyen günlerde hücreler faz kontrast mikroskobu (DMI6000B Inverted Mikroskop, Leica, Westlar, Almanya) altında kontrol edildi ve resimlendi. Her iki günde bir besiyerleri değiştirildi. T25 flasklar %80 konfluent olduğunda tripsin kullanılarak pasajlandı. Birinci pasajdan sonra hücrelerin bir kısmı dondurulup kriovial (6122-SO, SSI Bio, ABD) içerisinde ileri dönemde kullanılmak üzere azot tankına (-196°C) kaldırılıp saklandı. İkinci pasajdan sonra hücre hattı hücreleri primer granüloza hücrelerinde olduğu gibi komplet DMEM-F12 ve BIO-AMF 1 besiyeri kullanılarak kültüre edilmeye devam edildi. Flaskların besiyeri iki günde bir değiştirildi. Hücreler 4. pasaja geldiklerinde deneyler için kullanıldı.

3.2.5. Granüloza Hücresi Pasajlanması

Faz kontrast mikroskobu (TMS Inverted Mikroskop Nikon, Japonya) ile incelenen flaskta %80 ve üzeri konfluensi görüldüğünde hücreler pasajlandı. Flasktaki besiyeri çekildikten sonra 37°C derecedeki dPBS ile yıkandı. Sonrasında en fazla 5 dakika olmak üzere tripsin (TRY-1B10, Capricorn Scientific, Almanya) ile inkübe edildi. Flask yüzeyi ile temasını kaybetmeyen hücreler mekanik olarak kaldırılmaya çalışıldı. Devamında 1:1 komplet DMEM-F12 besiyeri eklenerek tripsin nötralize edildi. Tripsin-besiyeri karışımı 15 cc'lik santrifüj tüpüne alınarak santrifüjde 5 dakika 1200 rpm (260 G) de çevrildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet 1 ml besiyeri ile çözüldü. Hücre sayımı yapıldıktan sonra eşit

miktarlarda bölünerek yeni T25 flasklara ekildi. İlk ekimde 1:1 komplet DMEM-F12 ve komplet BIO-AMF 1 besiyeri karışımı kullanıldı. Sonraki beslemelerde sadece komplet DMEM-F12 besiyeri kullanılmıştır.

3.2.6. Granüloza Hücresi Sayımı

Kaldırılan granüloza hücrelerinden oluşan pellet üzerine 1 ml besiyeri eklendikten sonra, 100 µl'si alındı ve üzerine 900 µl besiyeri ilave edilerek 1:10 oranında sulandırıldı. Seyreltik çözeltiden 100 µl alınarak üzerine 100 µl tripan mavisi (% 0,4) eklendi. Bu karışımdan 10 µl alınarak hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Hemositometrede sayılarının ortalaması (n) alındıktan sonra toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanarak belirlendi:

$$N = n \times 10 \times 2 \times 10^4$$

N (toplam hücre sayısı)

n (toma lamında sayılan hücre sayılarının ortalaması)

x 10 (10 kat seyreltmeden dolayı)

x 2 (tripan mavisi ile birebir seyreltildiğinden)

x 10⁴ (formül katsayısı)

3.2.7. Granüloza Hücrelerinin Dondurulması

Konflüensi değerlendirilmesinde %80 ve üzeri değere ulaşan hücreler tripsinle kaldırılıp, santrifüj sonrası pellet haline getirildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 700 µl DMEM-F12 besiyeri ile çözülerek hücre krayovial alındı. Üzerine 200 µl FBS eklendikten sonra ve 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (D2650, Sigma Aldrich, ABD) buz üzerinde eklenip, kryovialleri dondurmak için coolcell kabına (BCS-136 CoolCell, Biocision, ABD) alınarak -80°C derin dondurucuya (DF290, Nüve, Türkiye) alındı. Bir gece buzdolabında bekletilen tüpler sıvı azot tankına (Carbide 35HC LN2, Taylor Wharton Union, ABD) aktarıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücre dondurma tüpleri içerisinde dondurulmuş granüloza hücreleri

3.2.8. Dondurulmuş Granüloza Hücrelerin Çözülmesi

Azot tankında bulunan hücreler alınarak hızlı bir şekilde 37°C derecede su banyosuna konuldu. Kültür laboratuvarında önceden hazırlanmış besiyerine 1:9 oranında eklenerek santrifüj (1200 rpm, 5 dakika) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pellet, 1 ml komplet DMEM-F12 besiyeri ile çözülerek kültüre hazır hale getirildi.

3.2.9. Siklopaminin Hazırlanması

Liyofilize olarak gelen siklopamin (C4116-1MG, Sigma Aldrich, ABD) 0,2 ml DMSO ile çözüldü. Böylelikle stok çözelti 5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı. Hedef konsantrasyon olan 10 μ M'a (Lin Y. et al 2017, Du K. et al 2018) ulaşmak için 10 ml komplet besiyerine 8,23 μ l stok çözelti eklendi.

3.2.10. FF-MAS'in Hazırlanması

Liyofilize 1 mg FF-MAS (700077P-1MG Avanti Polar Lipids, ABD) absolü etanol içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı (2.435 mM). WST-1 (11644807001, Roche, İsviçre) testi ile etkin ve toksik olmayan en yüksek doza ulaşmak için 100 μ g/ml, 10 μ g/ml ve 0.1 μ g/ml dozları denendi. 100 μ g/ml konsantrasyonda 2 ml besiyeri hazırlamak için 200 μ l ana stoktan alınarak 1.8 ml besiyeri ile karıştırıldı. 10 μ g/ml konsantrasyonunda 2 ml besiyeri hazırlamak için 20

μ l ana stoktan alınarak 1.98 ml besiyeri ile karıştırıldı. 0.1 μ g/ml konsantrasyonunda 2 ml besiyeri hazırlamak için 0.2 μ l ana stoktan alınarak 1.998 ml besiyeri ile karıştırıldı.

3.2.11. Granüloza Hücre Proliferasyon Değerlendirmesi (Doubling time)

Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. 96 kuyulu plaklara 100 μ l besiyeri içersinde 4×10^3 hücre ekilip üzerine cell proliferating reagent-WST1 hazır çözeltisinden (11644807001, Roche, İsviçre) kuyucuk başına 10 μ l eklendi. 4 saat 37°C %5 CO₂ içeren inkübatörde, nemli ortamda inkübasyon yapıldı. İnkübatörden alınan 96 kuyulu plak 1 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletilip, ELIZA mikropalak okuyucusunda (VersaMax™ ELISA Microplate Reader, Molecular Devices®, ABD) 420-480 nm dalga boyunda okutuldu.

3.2.12. Granüloza hücrelerinde etkili FF-MAS dozunun bulunması

Her bir katılımcıdan elde edilen hücreler 96 kuyulu plaklara (701001, Nest Scientific, Çin) 24-48-72 saatlerde, 0.1-10-100 μ g/ml dozlarında FF-MAS eklenerek 48 saat optimal kültür koşullarında (37°C, pH:7.4, %5 CO₂ içeren inkübatörde [HERACell, Hereaus, Almanya], nemli ortamda) inkübe edildi. Bu işlem sonrasında WST-1 yöntemi ile hücre çoğalması test edildi. Test sonucuna göre ED50 eğrisi grafiği çizilip optimal doz belirlendi.

3.2.13. Primer hücre hatlarında ve HGL5 hücre hattında sitoELİZA

1×10^4 hücre 96 kuyulu plaklara ekildi. 24 saat sonra %80 konfluensi gösteren tüm gruplara ait hücreler; FF-MAS, FF-MAS + siklopamin, siklopamin ve sadece çözücü (kontrol) ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve fosfat tampon solüsyonu ile 5 dakika kuyular yıkandıktan sonra % 0.05 gluteraldehit ile oda sıcaklığında 10 dakika tespit edildi. PBS ile yıkanan hücreler oda sıcaklığında primer antikolar Anti-Smo rabbit anti human poliklonal antibody (bs-2801R, Bioss, ABD; 1/200 konsantrasyonunda) ve Anti Gli1 rabbit anti human poliklonal antibody (bs-1206R, Bioss, ABD; 1/200 konsantrasyonunda) ile 2

saat inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 111-035-003, Jackson ImmunoResearch, ABD; 1:1000 konsantrasyonunda) ile 1 saat inkübe edildi. PBS ile 5 dakika yıkama sonrası işaretlenmeyi göstermek için kromojen olan diamino benzidin-DAB (11718096001, Roche, İsviçre) ile 20 dakika karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak inkübe edildi. Sonrasında optik yoğunluk ölçümü ELISA okuyucusunda 490-650 nm dalga boyunda (Versamax microplate reader) gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Softmax Pro5 ile değerlendirildi.

3.2.14. HGL5 Hücre Hattı ve Primer Hücre Kültürü Hücrelerinde

İmmunositokimya Yöntemlerinin Uygulanması

Üretilen HGL5 hücre hattı ve primer hücre kültürü PKOS ve erkek faktörü (sağlıklı kontrol) granüloza hücre örneklerinde (P₄) immunofloresan ve immünoperoksidaz yöntemlerle immünositokimyasal işaretleme gerçekleştirildi.

İmmünperoksidaz işaretleme protokolü:

Hücre hattı ve primer kültürleri ait hücreler 1×10^4 hücre/kuyu olmak üzere 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için 24 saat beklendi. Hücreler konfluent olduktan sonra:

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
- Hücreler 5 dakika oda sıcaklığında %100 metanol ile tespit edildi ardından PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Çekirdekte ifade olan Gli1 için permabilizasyon, 5 dakika % 0,1 Tween20 (P1379, Sigma Aldrich, ABD) ile inkübe edilerek gerçekleştirildi. Bu işlem sitozolde eksprese olan SMO antikoruna için gerekli olmadığından yapılmadı. Permabilizasyon süresince SMO işaretleme yapılacak hücreler PBS içerisinde bekletildi. Ardından PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Enzim HRP kullanıldığından endojen peroksidaz blokajı için hidrojen peroksit blokaj solüsyonu (12 ml H₂O₂ [107209, Merck, Almanya] + 54 ml

metanol [LB,M,106009, Merck, Almanya] + 54 ml distile su) ile kesitler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında dokular 3'er kez 5 dakika PBS ile yıkandı.

- Spesifik olmayan boyanmayı engellemek amacıyla serum blokajı yapıldı. Bu işlem için blokaj solüsyonu (keçi serum 1:50 oranında %1 bovin serum albümin içeren PBS ile sulandırılarak hazırlandı) ile hücreler 1 saat inkübe edildi. Blokaj solüsyonundan sonra yıkama yapılmadı.
- Primer antikorlar olan Anti-Smo rabbit anti human poliklonal antikor (bs-2801R, Bioss, ABD; 1/200 konsantrasyonunda) ve Anti-Gli1 rabbit anti human poliklonal antikor (bs-1206R, Bioss; 1/200 konsantrasyonunda) uygun dilusyonda sulandırıldı. Hücreler primer antikor ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. Ardından preparatlar 3 kere 5 dakika PBS ile yıkandı.
- Uygun sekonder antikor (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 111-035-003, Jackson ImmunoResearch; 1:1000 konsantrasyonunda) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından üç kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- Uygun şekilde hazırlanan DAB (11718096001, Roche, İsviçre) ile inkübe edildi. Mikroskop altında boyama gözlenince çeşme suyu ile yıkama işlemi yapıldı.
- Mayer's hematoksilin ile 1 dakika çekirdek işaretlemesi yapıldı. Ardından çeşme suyu ile yıkandı.
- Dereceli alkollerle dehidratasyon ve ksilol ile şeffaflandırma işlemlerinden sonra entellan ile kapama yapılarak görüntülemeler gerçekleştirildi. Spesifik immün işaretlenmenin varlığı negatif ve pozitif kontrol boyamaları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

İmmünofloresan işaretleme protokolü:

Hücre hattı ve primer kültürlerle ait hücreler 1×10^4 hücre/kuyu olmak üzere özel 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için 24 saat beklendi. Hücreler konfluent olduktan sonra:

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
- Hücreler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında %100 metanol (LB,M,106009, Merck, Almanya) ile tespit edildi ardından 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- Çekirdekte ifade olan Gli1 için permabilizasyon, 5 dakika süreyle % 0,1 Tween20 ile inkübe edilerek gerçekleştirildi. Bu işlem sitozolde ifade olan SMO antikoru için gerekli olmadığından yapılmadı. Permabilizasyon süresince SMO işaretleme yapılacak hücreler PBS içerisinde bekletildi. Ardından PBS ile 3 kere 5 dakika yıkandı.
- Spesifik olmayan boyanmayı engellemek amacıyla serum blokajı yapıldı. Bu işlem için blokaj solüsyonu (keçi serum 1:50 oranında %1 bovin serum albümin içeren PBS ile sulandırılarak hazırlandı) ile hücreler 1 saat inkübe edildi. Blokaj solüsyonundan sonra yıkama yapılmadı.
- Primer antikorlar olan Anti-Smo rabbit anti human poliklonal antikor (bs-2801R, Bioss; 1/200 konsantrasyonunda) ve Anti-Gli1 rabbit anti human poliklonal antikor (bs-1206R, Bioss; 1/200 konsantrasyonunda) uygun dilusyonda sulandırıldı. Hücreler primer antikor ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. Ardından preparatlar 3 kere 5 dakika PBS ile yıkandı.
- Uygun sekonder antikor (Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), [111-545-003, Jackson Immuno Research; ABD] 1:1000 konsantrasyonunda) ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Ardından üç kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- Hücre çekirdekleri DAPI (H-2000, Vector Lab, ABD) ile işaretlendi.
- Floresan inceleme için uygun olan kapama medyumunu (H-2000, Vector Lab, ABD) ile kapatıldı.

- Spesifik immün işaretlenmenin varlığı negatif kontrol işaretlemeleri ile karşılaştırmalı olarak floresan mikroskobu altında yapıldı.

Kesitlerin Görüntülenmesi

İmmünperoksidaz uygulanan hücreler görüntüleme programı (LAS X, Leica, Almanya) kullanarak, Leica DM6B Upright ışık mikroskobu (Westlar,Almanya) ile görüntülendi. İmmünofloresan işaretlemeler görüntülenirken de yine aynı sistemin floresan ataçmanı kullanıldı. Hücrelerin fotoğraflarının elde edilmesinde Leica DFC7000T kamera (Westlar,Almanya) kullanıldı.

İmmünperoksidaz ve İmmünofloresan İşaretlenmesinin Değerlendirilmesi

İmmünositokimyasal işaretlemelerin değerlendirilmesi için 40 lık büyütmede, rastgele seçilen farklı 5 yada 7 alanda LAS X programı kullanılarak Leica DFC7000T kamera ile mikrograflar çekildi. İmmünperoksidaz işaretleme yapılan hücrelerde immünreaktivite semi-kantitatif olarak H-skor ile değerlendirildi. Bunun için primer antikolar ile işaretlenme yoğunluğu (0=boyanma yok, 1=zayıf boyanma, 2=fark edilebilen boyanma 3=güçlü, yoğun boyanma) ve işaretlenen hücrelerin yüzdesi (%0 - %100 arası) değerlendirildi. Değerlendirme 2 araştırmacı tarafından yapıldı ve 2 araştırmacıların ortalama skoru kullanıldı.

İmmünofloresan işaretlemelerin değerlendirilmesi için elde edilen çekirdek boyasının görüntülenmediği kanala ait mikrograflarda ImageJ (V. 1.53a, NIH, ABD) kullanılarak intensite ölçümleri yapıldı. Tüm mikrografların ölçümleri yapıldıktan sonra ortalamaları alınarak gruplar arası karşılaştırma gerçekleştirildi.

3.2.15. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler için R, SPSS ve Graphpad yazılımlarından faydalanıldı. Araştırma hipotezleri parametrik test varsayımlarının sağlandığından parametrik testler kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma için ihtiyaç duyulan örneklem genişliği parametrik testlere göre hesaplanmıştır. Gruplardan elde edilen ekspresyon düzeylerininin değişkenliği 0.45 birim olduğu ve örneklerden elde edilen

ekspresyon düzeylerinin zaman içindeki değişiminin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığının Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA yöntemi ile inceleneceği öngörülerek güç analizi yapılmış ve örneklem genişliği belirlenmiştir. Bu öngörüler altında 0.577 birimlik bir etki genişliğinin %90 güç ile anlamlı bir farklılık olarak tespit edilebilmesi için her bir deney grubuna 8 kişinin dahil edilmesine karar verilmiştir. Örneklem hesabı G-Power (v. 3.0.10) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Bağımlı gruplarda karşılaştırmalar Eşleştirilmiş t-testi ve Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA yöntemi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel önemlilik için $p < 0,05$ ise anlamlı kabul edilmiş ve istatistiksel analizlerde ve grafiklerin hazırlanmasında SPSS 21,0 for Windows ve GraphPad Prism 8.0 paket programı kullanılmıştır. Parametrik test varsayımları sağlandığından Wilcoxon İşaret testi ve Friedman Testi gibi parametrik olmayan yöntemler kullanılmamıştır. İstatistiksel değerlendirme sürecinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan yardım alınmıştır.

4. BULGULAR

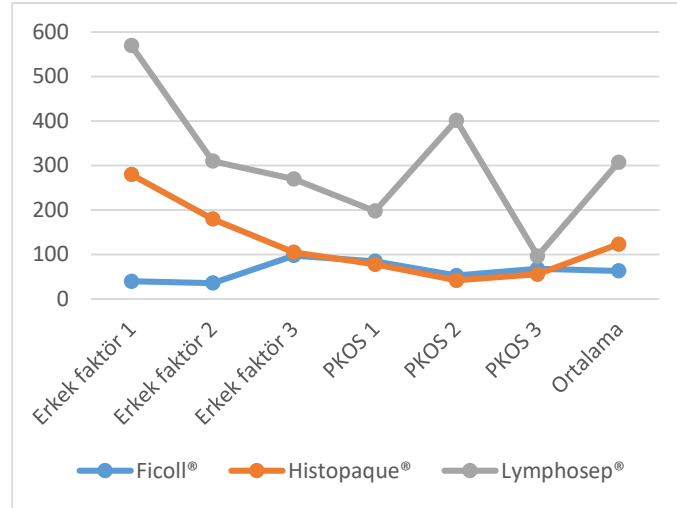
4.1. Primer Granüloza Hücre Kültürü

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'nden gelen 8 adet erkek infertilitesi sebebiyle tedavi gören sağlıklı kadınlar ve 8 adet PKOS nedeniyle tedavi gören kadınların folikül toplanma işlemi sonrasında elde edilen folikül sıvılarından granüloza hücreleri izole edilmiştir. İzole edilen hücreler en fazla 5. pasaja kadar çoğaltılmıştır. Deneyler 3 ve 4. pasaj hücreleriyle gerçekleştirildi.

İzolasyon yapılması için üç ayrı separasyon solüsyonu denenmiş, bunlardan en başarılı olan Lymphosep kullanılmıştır. Folikül sıvısı örnekleri, laboratuvara getirildikten sonra 1:1 oranında dPBS (Capricorn Scientific-PBS-1A) ile seyreltildi. Bu işlemin amacı mevcut hücre sayısını seyrelterek kayıp miktarını en aza indirmektir. Ayırıştırma için bundan önce kullanılan birden fazla solüsyon seçeneği mevcuttu (Lymphosep® L0560, Histopaque®-1077, Ficoll® PM 400). Kimyasal olarak benzer yapıda olan bu solüsyonlar 6 adet hastada (3 erkek faktör, 3 PCOS) aynı anda denendi. Bu denemelerde en başarılı olan Lymphosep® separasyon solüsyonuydu. Solüsyon başarısı, aynı miktar folikül sıvısının farklı ayırıştırma solüsyonlarıyla işleme alınması sonucunda elde edilen hücre sayılarına göre hesaplanmıştır (Tablo 4.1 ve 4.2). Sonrasında düşük serum – yüksek L-glutamin (sırasıyla %5 ve %4) içeren besiyerinde, hücreler tutunup çoğalmışlardı.

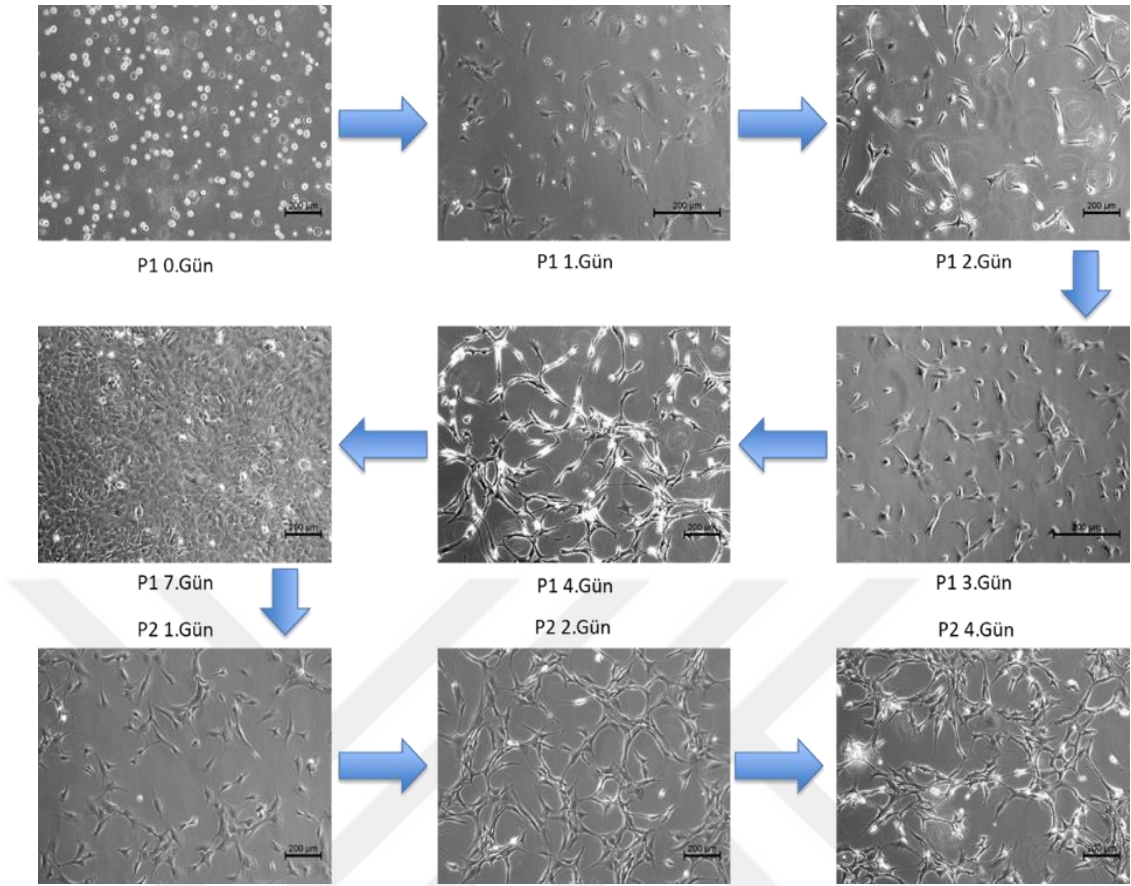
Tablo 4.1. Separasyon solüsyonlarına göre izole edilen hücre sayıları (x 10³)

	Ficoll®	Histopaque®	Lymphosep®
Erkek faktör 1	40	280	570
Erkek faktör 2	36	180	310
Erkek faktör 3	98	105	270
PKOS 1	85	78	198
PKOS 2	53	42	402
PKOS 3	68	56	97
Ortalama	63,33	123,5	307,83

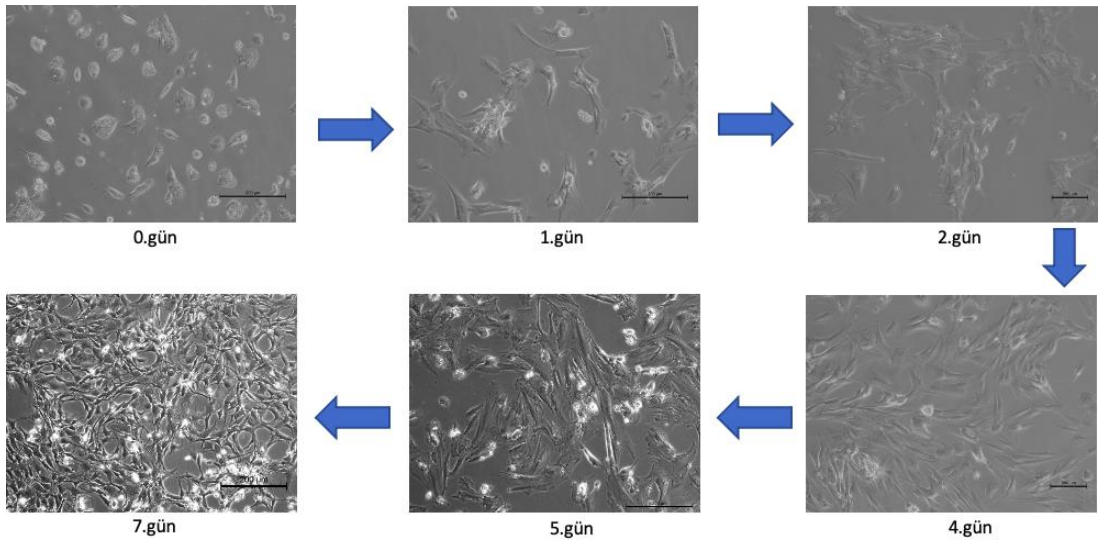


Şekil 4.1. Separasyon solüsyonlarına göre izole edilen hücre sayıları ($\times 10^3$)

Hücreler, ekimden sonraki 1-2 günde daha düşük bir alan kaplarlarken, 5-7. günlerde daha fazla alan kapladıkları gözlemlendi (Şekil 4.1 ve 4.2). Hücrelerin bölünme hızları hastadan hastaya fark etmektedir. Buna bağlı olarak ilk hücre ekiminde ve pasajlama işlemi sonrasında ilk beslemede komplet DMEM/F12 besiyeri 1:1 oranında komplet BioAMF 1 besiyeri ile karıştırılarak tutunma ve proliferasyon hızlarının artmış olduğu saptandı.



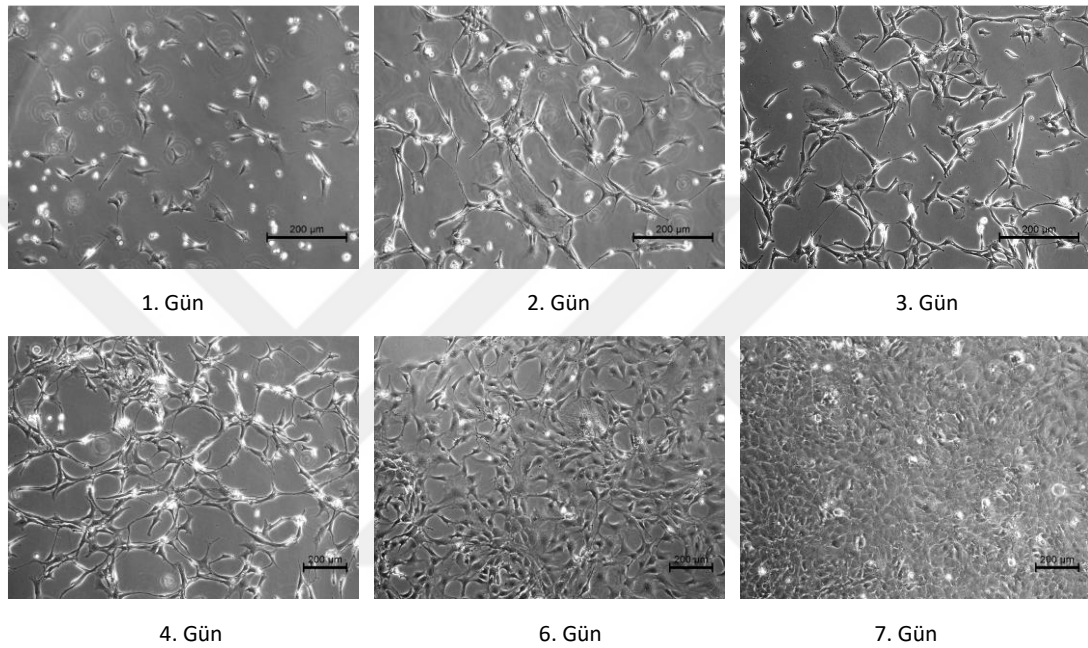
Şekil 4.1: İzole edilen PKOS granüloza hücrelerinin T25 faz kontrast mikroskobu mikrografları (x10)



Şekil 4.2. İzole edilen sağlıklı kadınlara ait granüloza hücrelerinin faz kontrast mikrogramları (x10)

4.2. HGL5 İnsan Granüloza Hücre Hattı ve Kültürü

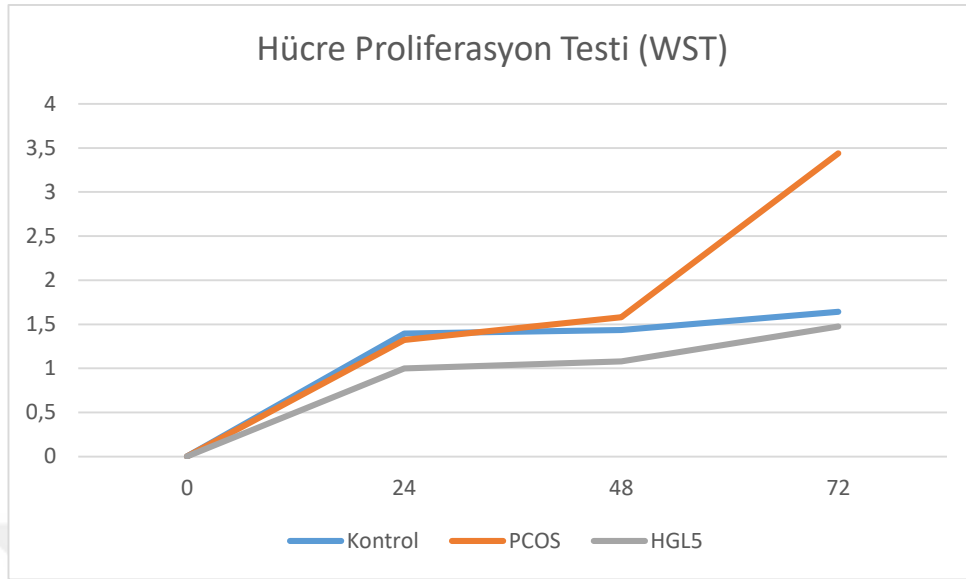
Donmuş halde ticari olarak satın alınan insan granüloza hücre hattı olan HGL5, sağlayıcı firmanın tavsiyesi doğrultusunda kendi besiyeri (Prigrow IV besiyerinde 2% Cosmic Calf Serum , 2% Ultroser G, 1% ITS plus ve penicillin/streptomisin/amfoterisin B solüsyonu) kullanılarak kültüre edildi. 5. pasaja kadar çoğaltılan hücrelerin 4. pasajında deneyler uygulandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. HGL5 hücre hattı hücrelerinin T25 flasttaki faz kontrast mikrografları (x10)

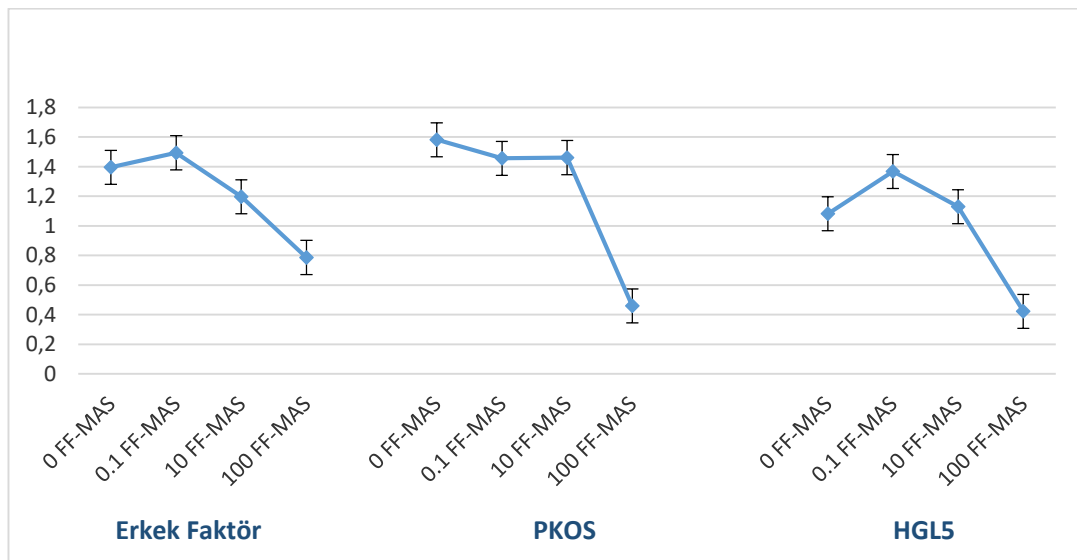
4.3. Hücre Proliferasyon Değerlendirmesi

Deney gruplarının ve HGL5 hücre hattının hücrelerinin proliferasyon değerlendirilmesi için WST-1 testi uygulandı. Her 3 örnekte de WST-1 sonucu 24 saat sonunda logaritmik olarak 1 değerinin üstüne çıktığı görüldü. Test sonuçlarına göre deneylerin gerçekleştirilmesi için, hücre ekiminden 24 saat sonrasının uygun olduğuna karar verildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Kontrol, PCOS ve HGL5 hücrelerinin WST sonuçları

4.4. Granüloza hücrelerinde etkili FF-MAS dozunun bulunması

Elde edilen erkek faktör, PKOS örnekleri ve HGL5 hücre hattı örneğinde etkin FF-MAS dozunun bulunması için WST-1 canlılık testi yöntemi uygulandı. Düz tabanlı ve kapaklı 96 kuyulu plakta her bir örnek için 6 kez tekrar edilerek toksik olmayan en yüksek dozun 48 saatte 10 μ M olduğu sonucuna ulaşıldı (Tablo 4.4). 0.1 ile 10 μ M arasında anlamlı fark olmamakla beraber, 10 ile 100 μ M arasında anlamlı fark gözlemlendi.

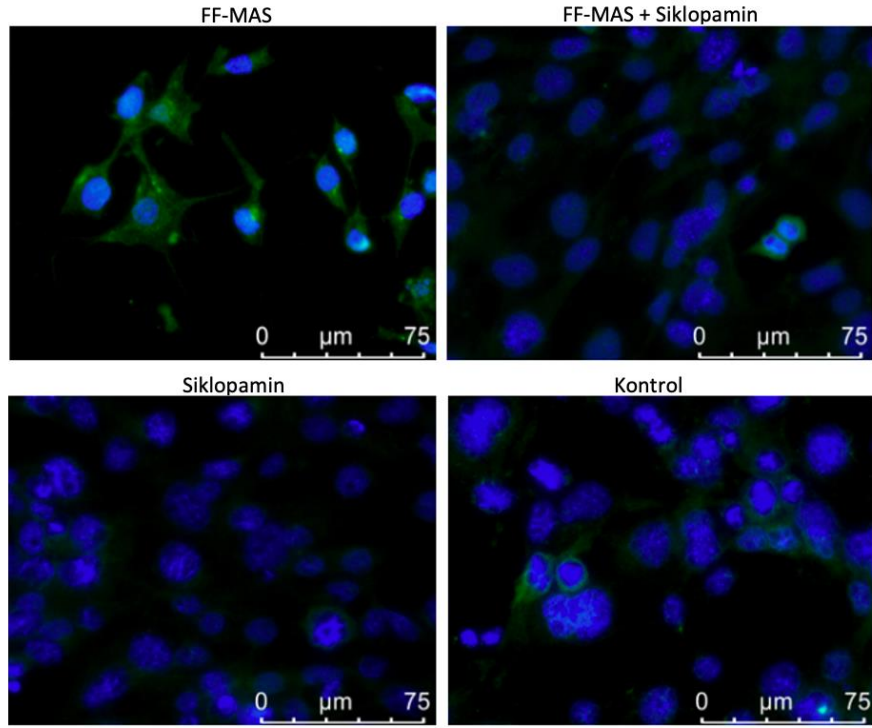
Tablo 4.3. 48. Saat FF-MAS dozunun WST sonuçları. Birinci çizgi kontrol grubuna, ikinci çizgi PCOS grubuna, üçüncü çizgi ise HGL5 hücre hattına aittir.

4.5. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Hücre Hattında İmmünofloresan İşaretleme

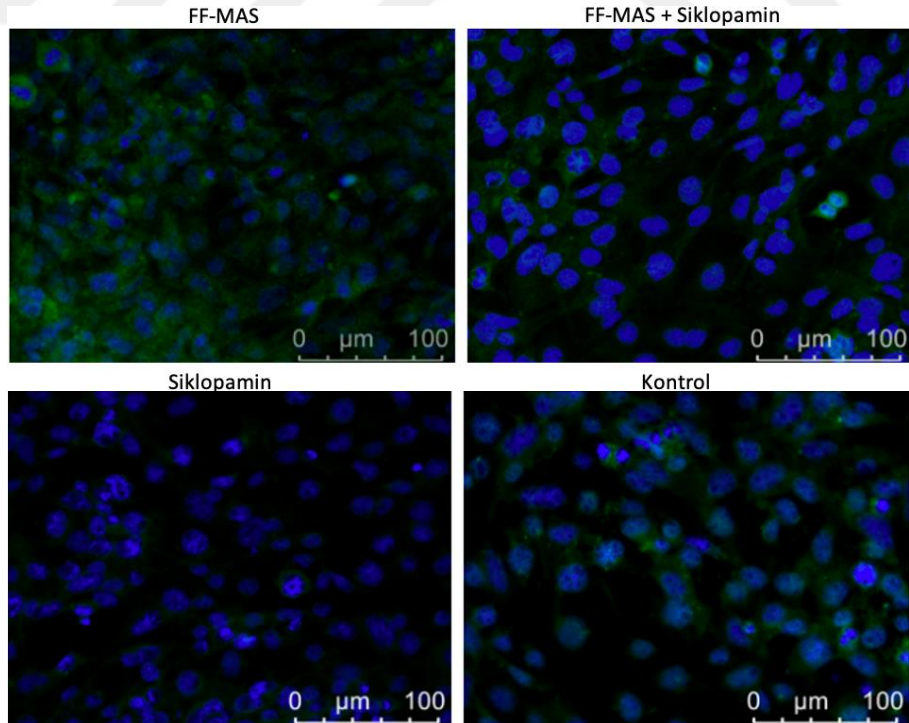
4.5.1. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında SMO İmmünofloresan Ekspresyonu

SMO proteini, transmembran bir protein olduğundan, immünofloresan ekspresyonu da membranla uyumlu olarak görüldü. Granüloza hücre membranlarında yaygın immünofloresan ekspresyonları izlendi. Çekirdekte ekspresyon görülmedi. SMO yeşil FITC boyası ile işaretlenirken, çekirdek DAPI boyası ile mavi olarak görüldü.

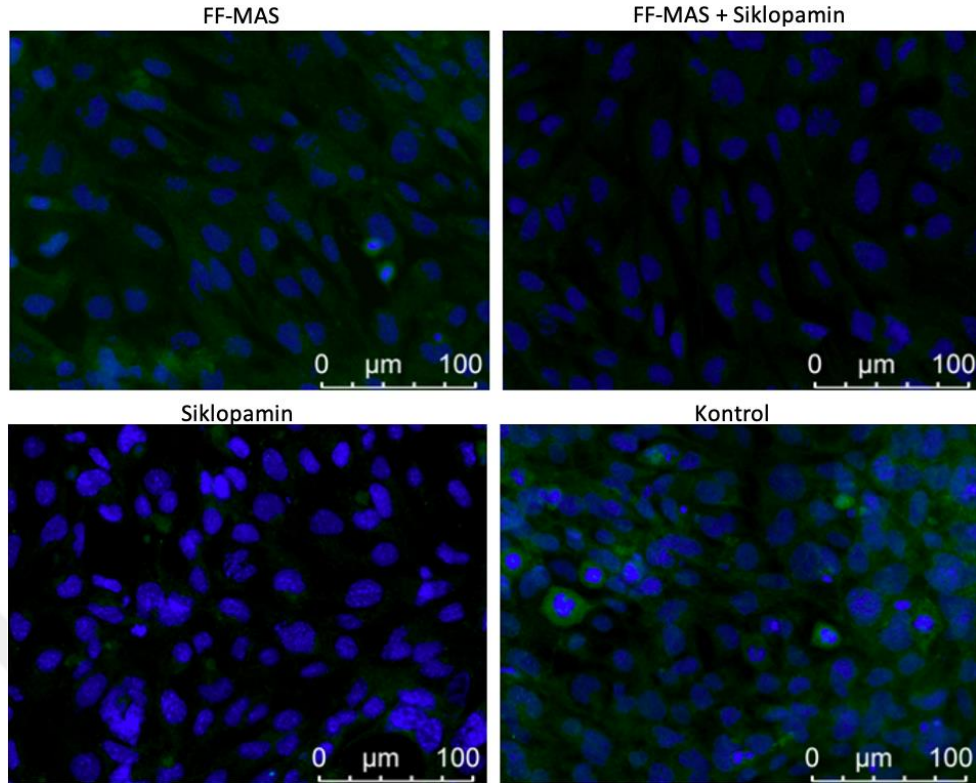
SMO ekspresyonu, benzer özellikleriyle hem sağlıklı kadın granüloza hücreleri hem de PKOS ana gruplarının tüm alt gruplarının granüloza hücrelerinde izlendi (Şekil 4.4 ve 4.5). Sağlıklı ve PKOS hastalarına ait tüm granüloza hücrelerinde ve HGL5 hücrelerinde FF-MAS verilsin yada verilmesin bazal olarak SMO proteinin eksprese olduğunu izlendi (Şekil 4.6). Tüm ana gruplarda, *in-vitro* koşullarda FF-MAS verilmesiyle, SMO ekspresyon şiddetinin anlamlı arttığı görüldü. Siklopamin ile Hh yolağı susturulan alt gruplarında ise SMO ifadesi en düşük şiddette görüldü.



Şekil 4.4. Erkek faktör grubu SMO immüno Floresan ekspresyonlarının mikroyrafları (x40). Yeşil renk membranöz SMO ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.5. PKOS grubu SMO immüno Floresan ekspresyonlarının mikroyrafları (x40). Yeşil renk membranöz SMO ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.6. HGL5 hücre hattı SMO immüno Floresan ekspresyonları mikrogramları (x40). Yeşil renk membranöz SMO ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.

4.5.2. SMO İmmüno Floresan Yoğunluk Analizi

SMO immüno Floresan işaretlemesi için sekiz kuyulu kültür lamlarında gerçekleştirilen deneylere göre hem HGL5 hem PKOS hem de erkek faktör gruplarının alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0.001$).

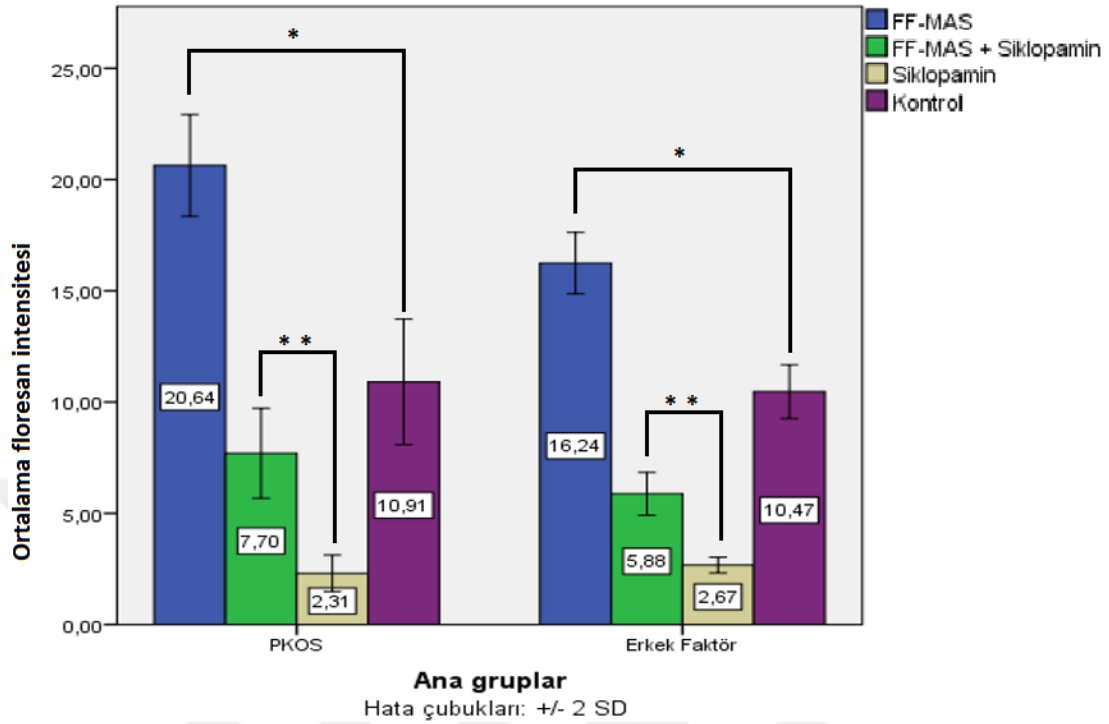
Erkek faktör nedeniyle başvuran sağlıklı kadınlara ait granüloza hücrelerine 48 saat 10 μ M FF-MAS inkübasyonu ile elde edilen SMO ekspresyon yoğunluk ölçüm sonuçları, diğer alt grupları olan FF-MAS + siklopamin, siklopamin ve kontrol gruplarına oranla anlamlı olarak yüksek saptandı ($p < 0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubundaki SMO ekspresyonu, sadece FF-MAS alt grubuna oranla anlamlı düşüş gösterdi ($p < 0.001$), ancak bu düşüş özellikle sadece siklopamin alt grubunda ise daha anlamlıydı. FF-MAS + siklopamin alt grubu, siklopamin grubuna oranla istatistiksel olarak yüksekti ($p = 0.001$). Sağlıklı kadınlara ait hücrelerin kontrol alt grubu, sadece FF-MAS verilen alt gruptan düşük SMO ekspresyonu gösterirken,

diğer iki alt gruptaki ekspresyondan istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı. ($p<0.05$) (Tablo 4.5).

PKOS tanısı almış IVF tedavisi gören kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerine 48 saat 10 μ M FF-MAS uygulanan alt grupta, diğer tüm PKOS alt gruplarına oranla SMO ekspresyonu yüksekti ($p<0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubu, sadece FF-MAS alt grubuna oranla olarak düşük iken ($p<0.001$), siklopamin alt grubundan anlamlı miktarda yüksekti ($p=0.001$). Siklopamin grubu, FF-MAS grubuna oranla istatistik olarak anlamlı düşükken ($p<0.001$), benzer olarak kontrol grubundan da düşük sonuçlara sahipti ($p<0.001$). Kontrol alt grubu FF-MAS alt grubuyla karşılaştırıldığında SMO ekspresyonu düşük bulundu ($p<0.001$). PKOS grubundan elde edilen bu sonuçlar erkek faktör grubuyla uyumlu idi.

Ana grupların alt grupları, birbirleriyle karşılaştırılınca istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Grup verileri alt gruplar arasında incelendiğinde homojen dağılım gösterdi. Her iki erkek faktör ve PKOS ana gruplarının FF-MAS, FF-MAS + siklopamin, Siklopamin ve kontrol alt gruplarının SMO immünofloresan ifade sonuçları uyumlu olarak elde edildi ancak anlamlı olmayan bir fark FF-MAS alt grupları arasında saptandı (PKOS FF-MAS grubu ortalama sonucu: 20,6365, erkek faktör FF-MAS grubu ortalama sonucu: 16,2419). Bu sonuç FF-MAS'in, PKOS hastalarına ait granüloza hücrelerinde daha iyi yanıt verdiğini ve Hedgehog yolacağını uyardığına işaret edebilir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir. HGL5 hücre hattı hücreleri sağlıklı katılımcıların granüloza hücreleri ile benzer sonuçlara sahipti.

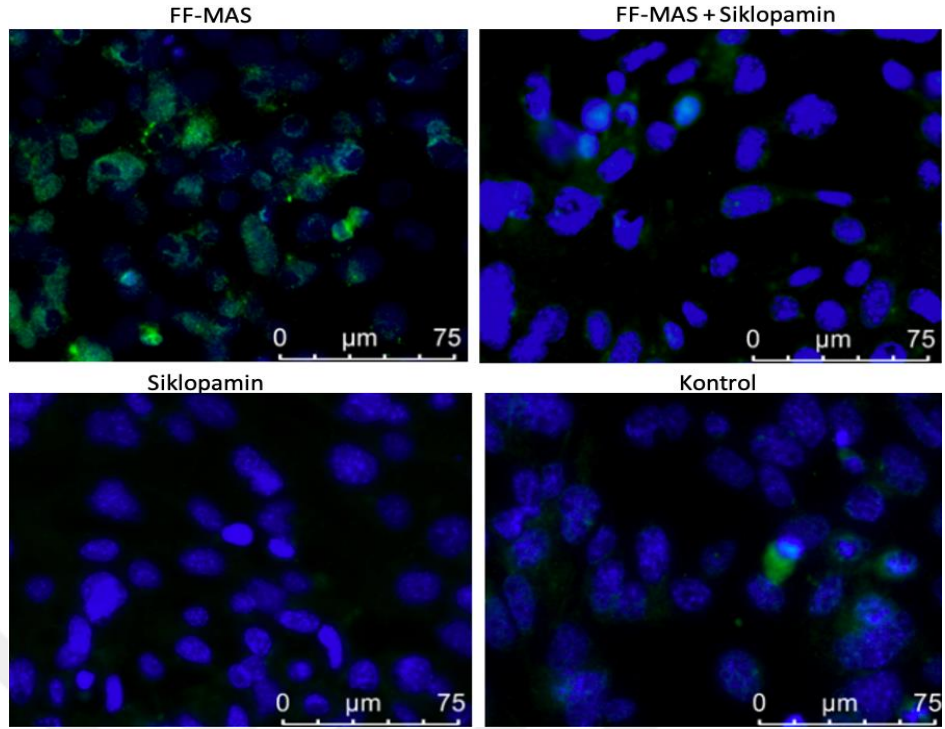
Tablo 4.4. Ana gruplara ait alt grup immünofloresan SMO ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması (her grup için n=8; *: p<0,01; **:p<0,05).



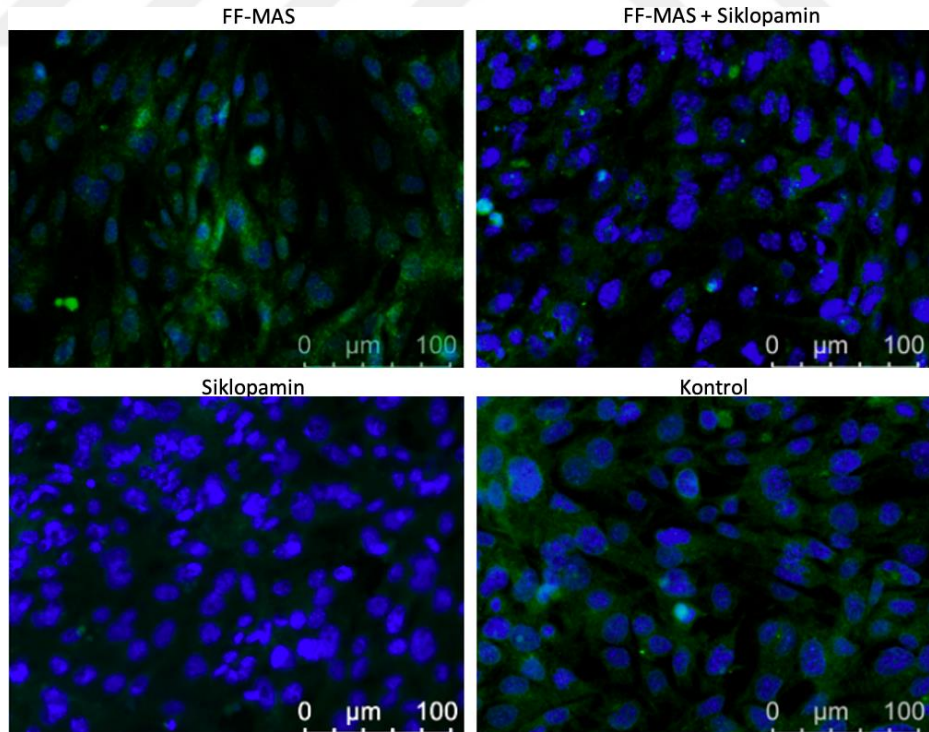
4.5.3. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında Gli1 İmmünofloresan Ekspresyonu

Gli1 proteini, sitoplazmada ve çekirdekte eksprese olan bir protein olduğundan, immünofloresan ekspresyonu da sitoplazma ve çekirdekte görüldü. Granüloza hücrelerinde yaygın immünofloresan ekspresyonları izlendi. Membranöz ekspresyon görülmeydi. Gli1 yeşil FITC boyası ile işaretlenirken, çekirdek DAPI boyası ile mavi olarak görüldü.

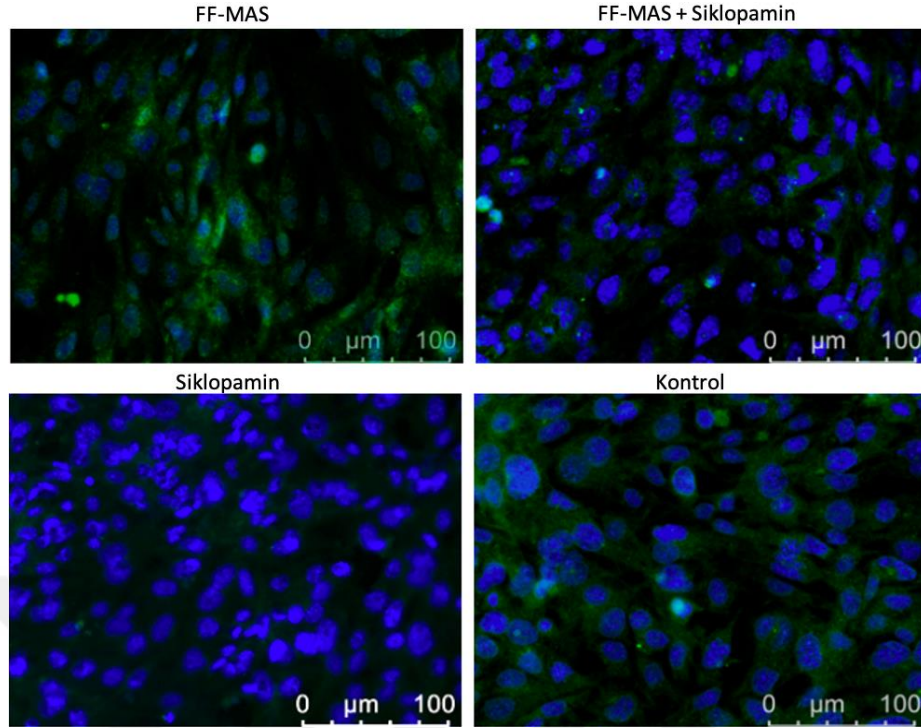
Gli1 ekspresyonu, benzer özellikleriyle hem sağlıklı kadın granüloza hücreleri hem de PKOS ana gruplarının tüm alt gruplarının granüloza hücrelerinde görüldü (Şekil 4.7 ve 4.8). Sağlıklı ve PKOS hastalarına ait tüm granüloza hücrelerinde ve HGL5 hücrelerinde FF-MAS verilsin yada verilmesin bazal olarak Gli1 proteinin eksprese olduğunu izlendi (Şekil 4.9). Tüm gruplarda, *in-vitro* FF-MAS verilmesiyle, SMO proteini gibi Gli1 ekspresyon şiddetinin arttığı görüldü. Siklopamin ile Hh yolağı susturulan alt gruplarında ise Gli1 ifadesi en düşük şiddette görüldü.



Şekil 4.7. Erkek faktör grubu Gli1 immüno Floresan ekspresyonları mikroyrafları (x40). Yeşil renk sitoplazmik ve çekirdekteki Gli1 ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.8. PKOS grubu Gli1 immüno Floresan ekspresyonları mikroyrafları (x40). Yeşil renk sitoplazmik ve çekirdekteki Gli1 ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.9. HGL5 hücre hattı Gli1 immüno Floresan ekspresyonları mikroyrafları (x40). Yeşil renk sitoplazmik ve çekirdekteki Gli1 ekspresyonunu, mavi renk çekirdeği göstermektedir.

4.5.4. Gli1 İmmüno Floresan Yoğunluk Analizi

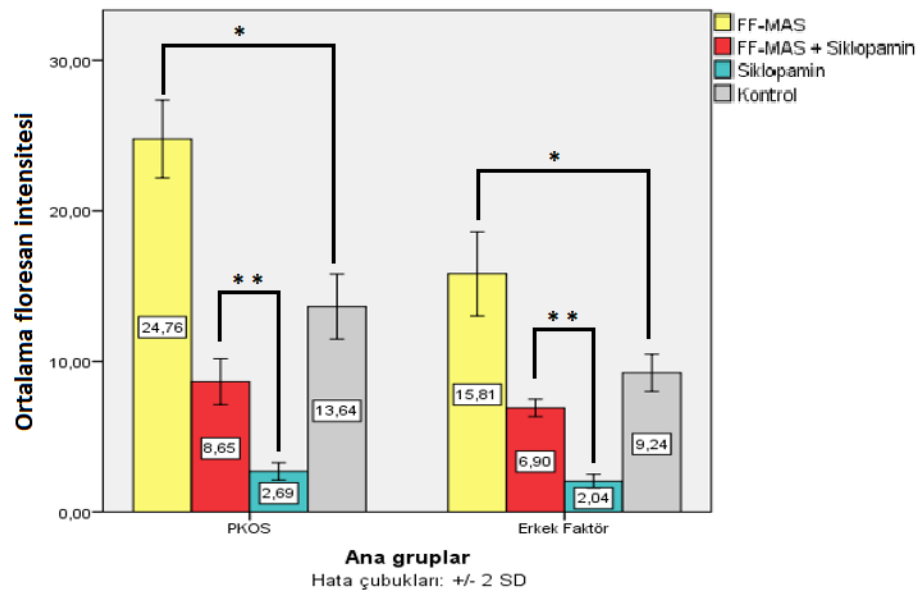
Gli1 immüno Floresan işaretlemeleri gibi sekiz kuyulu kültür lamalarında iki ana, dört alt grupta gerçekleştirilen Gli1 immüno Floresan işaretlemelerinde, tüm ana grupların alt grupları arasında istatistiksel fark izlenmiştir ($p < 0.001$).

İki ana gruptan erkek faktör nedeniyle başvuran sağlıklı kadınların granüloza hücrelerine 48 saat 10 μM FF-MAS inkübasyonu sonucunda elde edilen Gli1 ekspresyon yoğunluk ölçümü değerleri, diğer alt gruplardan istatistiksel olarak yüksekti ($p < 0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubundaki Gli1 ekspresyon sonucu, FF-MAS alt grubuna oranla olarak düşüktü (fark 8,91; $p < 0.001$), ancak FF-MAS alt grubu ve siklopamin alt grupları farkı ise daha anlamlıydı (fark 13,8; $p < 0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubu Gli1 ekspresyonu, siklopamin alt grubuna oranla daha yüksekti ($p < 0.001$). Kontrol alt grubu, FF-MAS alt grubundan anlamlı olarak düşük, siklopamin alt grubuna oranla anlamlı olarak yüksek ekspresyon göstermekteydi ($p < 0.001$). (Grafik 4.6).

PKOS tanısı alan ve IVF tedavisi gören kadınlara ait granüloza hücrelerine 48 saat 10 μ M FF-MAS uygulanan FF-MAS alt grubunda, diğer tüm PKOS alt gruplarına oranla anlamlı olarak Gli1 ekspresyonu yüksekti ($p \leq 0.001$). Erkek faktör grubuna benzer olarak, FF-MAS + siklopamin alt grubu, FF-MAS alt grubuna oranla anlamlı olarak düşük iken, siklopamin alt grubundan anlamlı miktarda yüksekti ($p=0.495$). Siklopamin grubu, FF-MAS grubuna oranla anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.001$), benzer olarak kontrol grubundan da düşük sonuçlara sahipti ($p < 0.001$). Kontrol alt grubu FF-MAS alt grubuyla karşılaştırıldığında Gli1 ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.018$).

Ana grupların alt grupları kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Her iki erkek faktör ve PKOS ana gruplarının FF-MAS + siklopamin, Siklopamin ve kontrol alt gruplarının Gli1 immünofloresan ifade yoğunluk sonuçları örtüşmekteydi. Ancak FF-MAS alt grupları karşılaştırması açısından PKOS grubu FF-MAS'e erkek faktör grubuna oranla daha iyi yanıt vermiş görülmektedir (PKOS FF-MAS grubu ortalama sonucu: 20,6365, erkek faktör FF-MAS grubu ortalama sonucu: 16,2419). Bu sonuç FF-MAS'in, PKOS hastalarına ait granüloza hücrelerinde bir miktar daha iyi yanıt verip Hedgehog yolağını daha yüksek miktarda uyardığına işaret edebilir.

Tablo 4.5. Ana gruplara ait alt grup immünofloresan Gli1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması (her grup için n=8; *: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$).

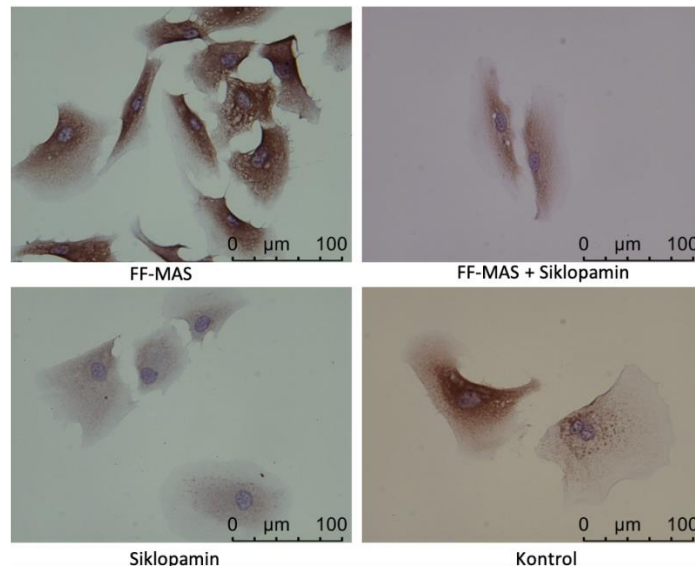


4.6. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Hücre Hattında İmmünperoksidaz İşaretleme

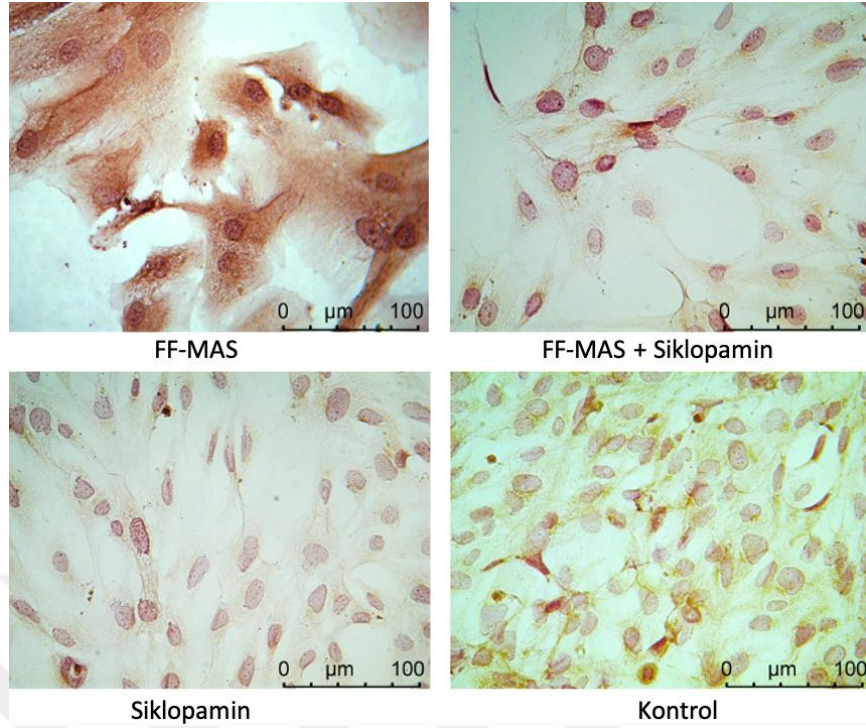
4.6.1. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında SMO İmmünperoksidaz Ekspresyonu

SMO proteini, transmembran bir proteindir ve bu sebeple membrana yerleşim göstermektedir. Bu yüzden immünperoksidaz ekspresyonu da membranla uyumlu olarak görüldü. Granüloza hücre membrannında yaygın immünperoksidaz ekspresyonu izlendi. Çekirdekte ekspresyon izlenmedi. SMO diaminobenzidin (DAB) boyası ile kahverengi işaretlenirken, çekirdek hematoxilen boyası ile mavi-mor olarak görüldü.

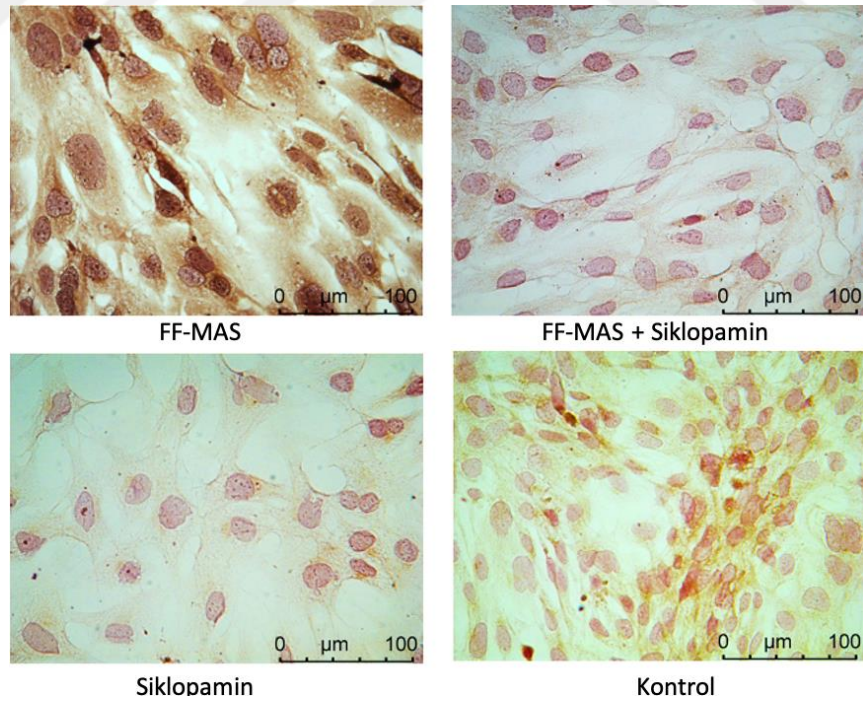
SMO ekspresyonu, hem sağlıklı kadınlara ait hem de PKOS ana gruplarının tüm alt gruplarının granüloza hücrelerinde, ayrıca HGL5 hücre hattı hücrelerinde eksprese olmaktadır (Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12). Sağlıklı ve PKOS hastalarına ait tüm granüloza hücrelerinde ve HGL5 hücrelerinde FF-MAS verilsin yada verilmesin, SMO proteinin eksprese olduğunu izlendi. Tüm gruplarda, *in-vitro* FF-MAS verilmesiyle, SMO ekspresyon şiddetinin anlamlı arttığı görüldü. Siklopamin ile Hh yolağı susturulan alt gruplarında ise SMO ifadesi en düşük şiddette görüldü.



Şekil 4.10. Erkek faktör grubu SMO immünperoksidaz ekspresyonları mikrografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.11. PKOS grubu SMO immünperoksidaz ekspresyonları mikrografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.12: HGL5 hücre hattı SMO immünperoksidaz ekspresyonları mikrografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir.

4.6.2. SMO İmmünperoksidaz Yoğunluk Analizi

Sekiz kuyulu kültür lamalarında gerçekleştirilen SMO immünperoksidaz işaretleme deney sonuçlarına göre hem primer hücre kültürleri hem de HGL5 hücre hattına ait alt gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p<0.001$).

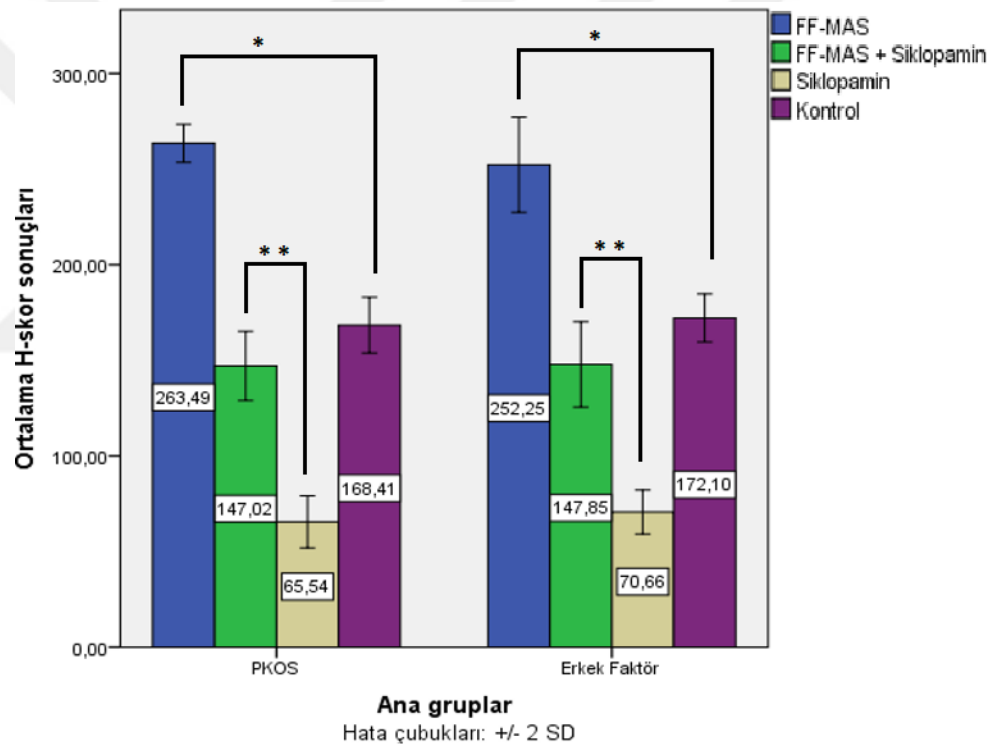
Sağlıklı kadınlardan alınan folikül sıvılarından izole edilen granüloza hücrelerine 48 saat $10\mu\text{M}$ FF-MAS inkübasyonu ile elde edilen SMO ekspresyonlarının H-skor sonuçları, diğer alt gruplardan yüksekti ($p<0.001$). Yine sağlıklı kadınlara ait hücrelerdeki FF-MAS + siklopamin alt grubuna ait SMO ekspresyonu, sadece FF-MAS verilen alt gruba oranla anlamlı düşüş gösterdi ($p<0.001$), ve bu düşüş özellikle sadece siklopamin alt grubunda ise daha anlamlıydı (FF-MAS grubu yaklaşık 253; siklopamin grubu yaklaşık 71). FF-MAS + siklopamin alt grubu, siklopamin grubuna oranla istatistiksel olarak yüksekti ($p<0.001$). Sağlıklı kadınlara ait hücrelerin kontrol alt grubu, sadece FF-MAS verilen alt gruptan düşük SMO ekspresyonu gösterirken, diğer iki alt gruptaki ekspresyondan istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı. ($p<0.001$) (Tablo 4.7).

PKOS tanısı almış IVF tedavisi gören kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerine 48 saat $10\mu\text{M}$ FF-MAS uygulanan alt grupta, diğer tüm PKOS alt gruplarına oranla anlamlı olarak SMO ekspresyonu yüksekti ($p<0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubu, sadece FF-MAS alt grubuna oranla anlamlı olarak düşük iken ($p<0.001$), siklopamin alt grubundan anlamlı miktarda yüksekti ($p=0.001$). Siklopamin grubu, FF-MAS grubuna oranla istatistik olarak anlamlı düşüken ($p<0.001$), benzer olarak kontrol grubundan da düşük sonuçlara sahipti ($p<0.001$). Kontrol alt grubu FF-MAS alt grubuyla karşılaştırıldığında SMO ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). PKOS grubundan elde edilen bu sonuçlar erkek faktör grubuyla uyumlu idi. HGL5 hücre hattı hücreleri sağlıklı katılımcıların granüloza hücreleri ile benzer sonuçlara sahipti.

Sağlıklı kadın ve PKOS hastaları ana gruplarının alt grupları kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Her iki erkek

faktör ve PKOS ana gruplarının FF-MAS + siklopamin, Siklopamin ve kontrol alt gruplarının SMO immünperoksidaz ifade skorlarının sonuçları örtüşmekteydi. Ancak FF-MAS alt grupları karşılaştırması yapıldığında istatistiksel fark olmasa da (0,262) PKOS grubu FF-MAS'e erkek faktör grubuna oranla daha iyi yanıt vermiş görülmektedir (PKOS FF-MAS grubu ortalama sonucu: 264, erkek faktör FF-MAS grubu ortalama sonucu: 253). Bu sonuç ile FF-MAS'in, PKOS hastalarındaki granüloza hücrelerin açısından daha iyi yanıt verip, araştırdığımız Hedgehog yolağını daha fazla uyardığı sonucu çıkarılabilir.

Tablo 4.6. Ana gruplara ait alt grup immünperoksidaz SMO ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması (her grup için n=8; *: p<0,01; **:p<0,05).

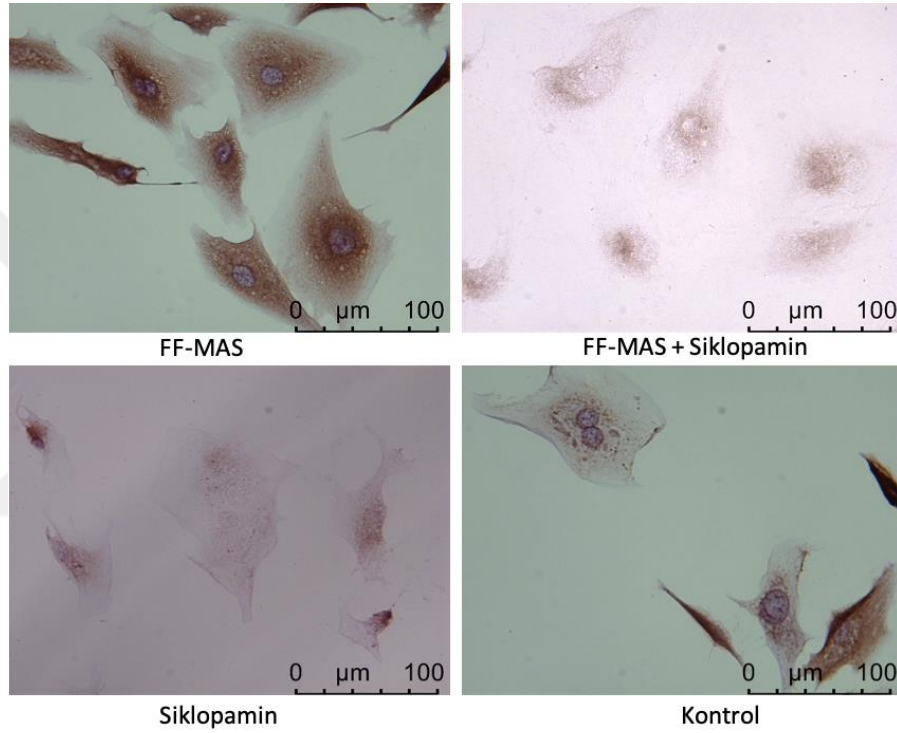


4.6.3. Primer Granüloza Hücrelerinde ve HGL5 Hücre Hattında Gli1 İmmünperoksidaz Ekspresyonu

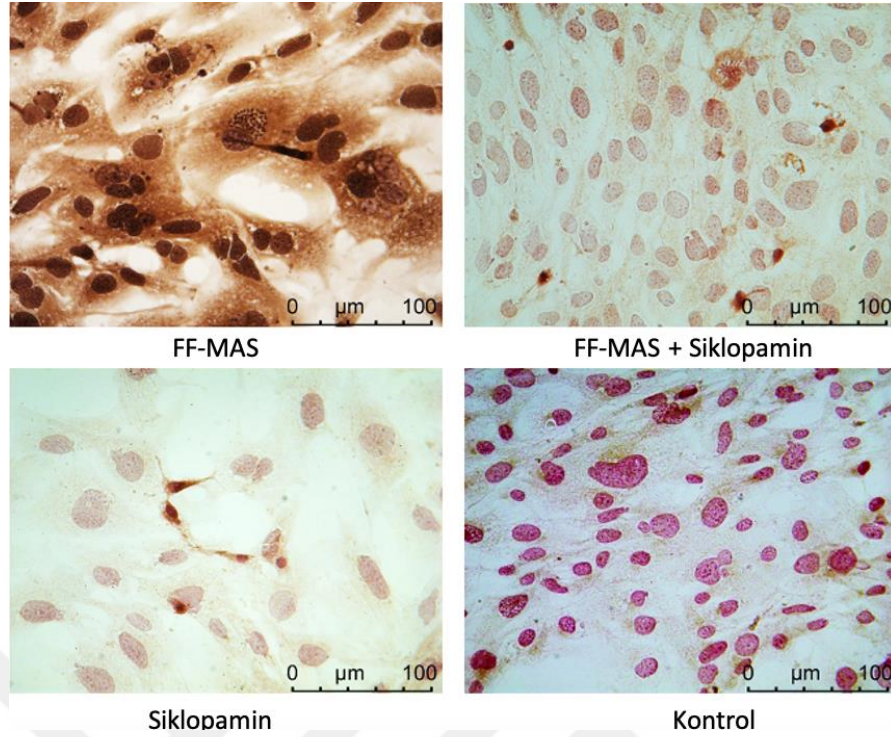
Gli1 proteini, sitoplazmada ve çekirdekte eksprese olan bir proteindir ve bu sebeple genellikle çekirdek etrafında ve çekirdek üzerinde yerleşim göstermektedir. Yapılan immünperoksidaz Gli1 işaretlemelerinde, granüloza hücrelerinde de genellikle çekirdekte olmak üzere sitoplazmada da ekspresyon izlendi. Membrana

uyumlu ekspresyon izlenmedi. Gli1 diaminobenzidin (DAB) boyası ile kahverengi işaretlenirken, çekirdek hematoksilin boyası ile mavi-mor olarak görüldü.

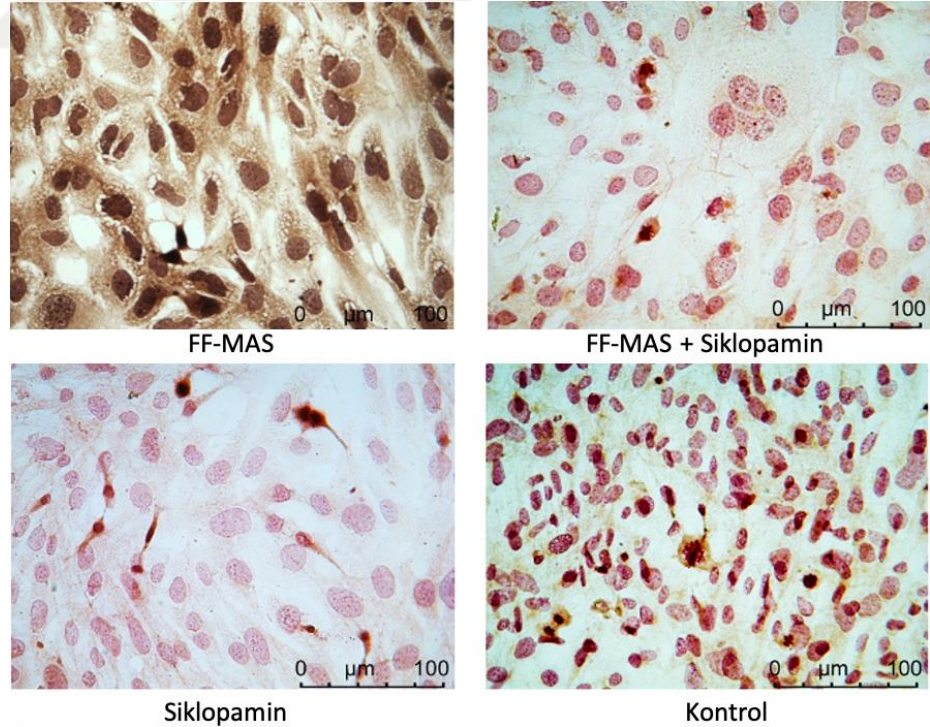
Gli1 ekspresyonu, hem sağlıklı kadınlara ait hem de PKOS ana gruplarının tüm alt gruplarının granüloza hücrelerinde, ayrıca HGL5 hücre hattı hücrelerinde eksprese olmaktaydı (Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15). Tüm gruplarda, *in-vitro* FF-MAS verilmesiyle, Gli1 ekspresyon şiddetinin anlamlı artışı izlendi. Siklopamin ile Hh yolağı susturulan alt gruplarında ise Gli1 ifadesi en düşük şiddette görüldü.



Şekil 4.13. Erkek faktör grubu Gli1 immünperoksidaz ekspresyonları mikrografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.14. PKOS grubu Gli1 immünperoksidaz ekspresyonları mikrografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir.



Şekil 4.15. HGL5 hücre hattı Gli1 immünperoksidaz ekspresyonları mikrografları (x40). Kahverengi renk membranöz SMO ekspresyonunu, mor-mavi renk çekirdeği göstermektedir.

4.6.4. Gli1 İmmünperoksidaz Yoğunluk Analizi

Gli1 immünperoksidaz işaretlemeleri sekiz kuyulu kültür lamalarında iki ana, dört alt grupta gerçekleştirilen Gli1 immünperoksidaz işaretlemelerinde, tüm ana gruplardaki alt grupların birbirleri arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmiştir ($p<0.001$).

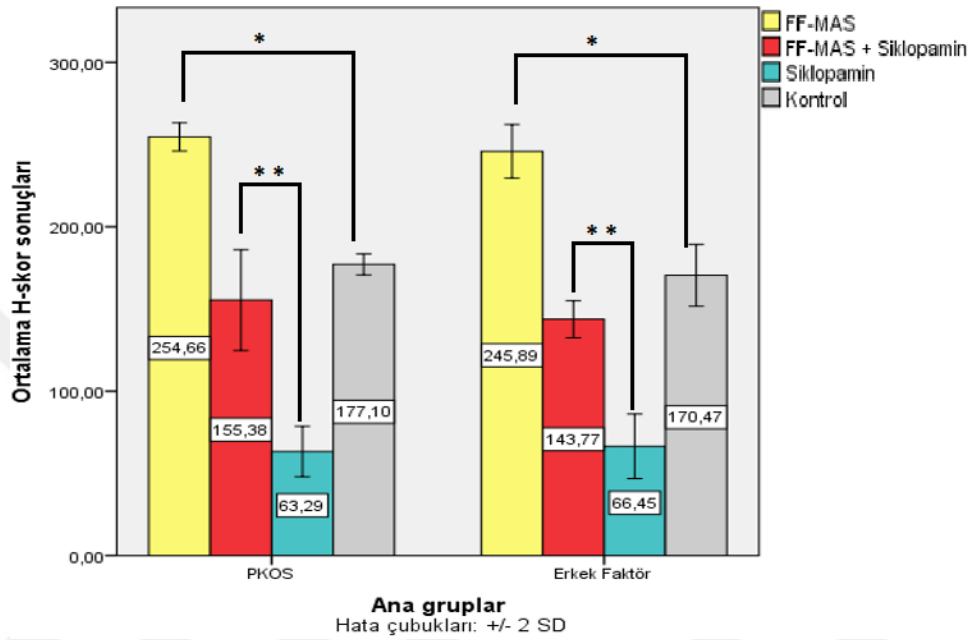
Erkek faktör granüloza hücrelerine FF-MAS verilmesi sonucunda elde edilen Gli1 ekspresyon yoğunluk ölçümü değerleri, diğer alt gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p<0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubundaki Gli1 ekspresyonu, FF-MAS alt grubu sonucuna kıyasla düşüktü (ortalama fark:102,11; $p<0.001$), ancak FF-MAS alt grubu ve siklopamin alt grupları farkı ise daha anlamlıydı (ortalama fark:179,44; $p<0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubu, siklopamin alt grubuna oranla daha yüksek Gli1 ekspresyonu gösteriyordu (ortalama fark:77,33; $p<0.001$). Kontrol alt grubu, FF-MAS alt grubundan anlamlı olarak düşük, siklopamin alt grubuna oranla anlamlı olarak yüksek Gli1 ekspresyonuna sahipti ($p<0.001$). (Tablo 4.8).

PKOS tanılı hastaların granüloza hücrelerine FF-MAS uygulanması sonrası FF-MAS alt Gli1 ekspresyonu diğer alt gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı miktarda artış gösterdi ($p\leq 0.001$). Erkek faktör grubuyla benzer olarak, FF-MAS + siklopamin alt grubu, FF-MAS alt grubundan anlamlı olarak düşük ekspresyona sahipken, sadece siklopamin verilen alt gruptan anlamlı miktarda yüksekti ($p<0.001$). Siklopamin alt grubu, FF-MAS alt grubundan anlamlı olarak düşük ekspresyona sahipti ($p<0.001$), benzer olarak kontrol grubundan da düşük sonuçlar izlendi ($p<0.001$). Kontrol alt grubunda da, FF-MAS verilen alt grupla karşılaştırıldığında Gli1 ekspresyonu anlamlı olarak düşük izlendi ($p<0.001$).

Ana grupların alt grupları kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Her iki erkek faktör ve PKOS ana gruplarının FF-MAS + siklopamin, Siklopamin ve kontrol alt gruplarının Gli1 immünperoksidaz ifade sonuçları örtüşmekteydi. Ancak FF-MAS alt grupları karşılaştırması açısından PKOS grubu FF-MAS'e erkek faktör grubuna oranla daha iyi yanıt vermiş görülmektedir (PKOS FF-MAS grubu ortalama sonucu: 254,6611, erkek

faktör FF-MAS grubu ortalama sonucu: 245,8861). Bu sonuç ile FF-MAS'ın, PKOS hastalarına ait granüloza hücrelerinde Hedgehog yolağını uyarması açısından bir miktar daha fazla yanıt oluşturduğunu gösterebilir.

Tablo 4.7. Ana gruplara ait alt grup immünperoksidaz Gli1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması (her grup için n=8; *: p<0,01; **:p<0,05).



4.7. Primer Hücre Hatlarında ve HGL5 Hücre Hattında sitoELİZA Ölçümleri

4.7.1. SMO sitoELİZA Sonuçları

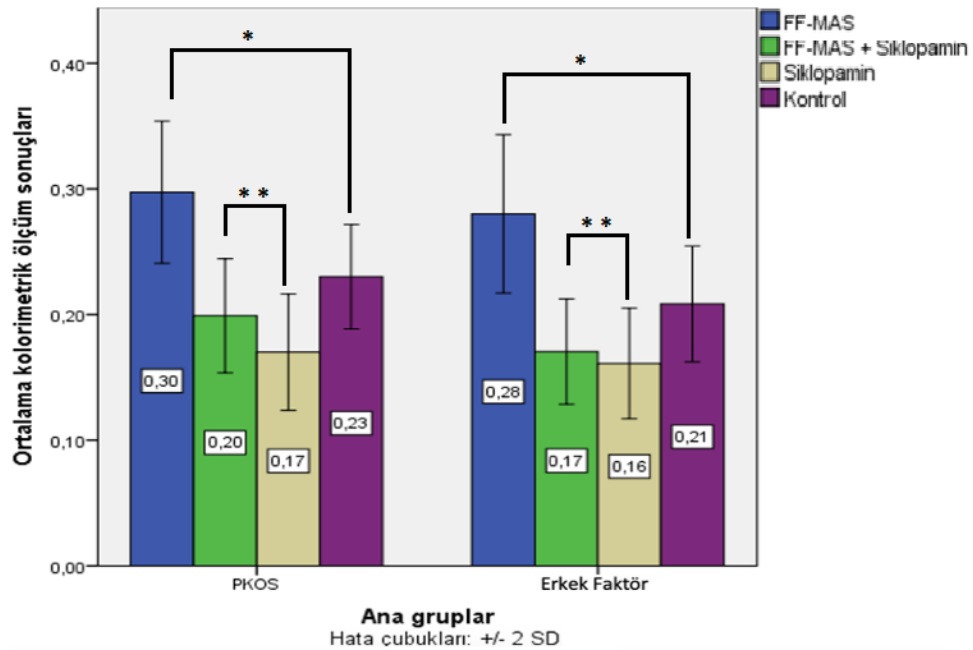
Düz tabanlı 96 kuyulu plaklarda gerçekleştirilen SMO immünperoksidaz işaretlemelerin, plak okuyucuda kantitatif kolorimetrik absorbans sonuçlarına göre primer hücre kültürlerine ait granüloza hücrelerinin ve HGL5 hücre hattına ait hücrelerin alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0.001).

Erkek faktör sebebiyle IVF tedavisine başvuran kadınlara ait folikül sıvılarından izole edilen granüloza hücrelerine 48 saat 10µM FF-MAS inkübasyonu ile elde edilen SMO ekspresyonlarının absorbans sonuçları, diğer alt gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı miktarda yüksekti (p<0.05). Yine bu ana gruba ait hücrelerdeki FF-MAS + siklopamin alt grubunun SMO ekspresyonu, sadece FF-MAS verilen alt gruba oranla anlamlı düşüş gösterdi (p<0.001). Bu ana gruptaki sadece

siklopamin alt grubunda ise daha anlamlıydı (FF-MAS grubu ortalama 0,28 ; siklopamin grubu ortalama 0,16). FF-MAS + siklopamin alt grubu, siklopamin grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek sonuca sahipti ($p=0.467$). Sağlıklı kadınlara ait hücrelerin kontrol alt grubu, sadece FF-MAS verilen alt gruptan düşük SMO ekspresyonuna sahipken, kontrol alt grubu siklopamin verilen diğer iki alt grup ekspresyonundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (Tablo 4.9).

PKOS tanılı kadınlara ait granüloza hücrelerine 48 saat 10 μ M FF-MAS uygulanan alt grupta, diğer tüm PKOS alt gruplarına oranla anlamlı olarak SMO ekspresyonu yüksek tespit edildi ($p<0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubu, sadece siklopamin verilen alt gruptan istatistiksel olarak anlamlı olmayan miktarda yüksekti (FF-MAS + siklopamin: 0,20; sadece siklopamin: 0,17). Siklopamin alt grubu, kontrol alt grubundan da düşük sonuçlara sahipti ($p<0.001$). Kontrol alt grubu FF-MAS alt grubuyla karşılaştırıldığında SMO ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). HGL5 hücre hattı hücreleri ile PKOS grubu ve erkek faktör grubunun alt grup sonuçları uyumlu idi.

Tablo 4.8. Ana gruplara ait alt grup sitoELİZA SMO ekspresyon ölçüm sonuçlarının karşılaştırması (her grup için $n=8$; *: $p<0,01$; **: $p<0,05$).



4.7.2. Gli1 sitoELİZA Sonuçları

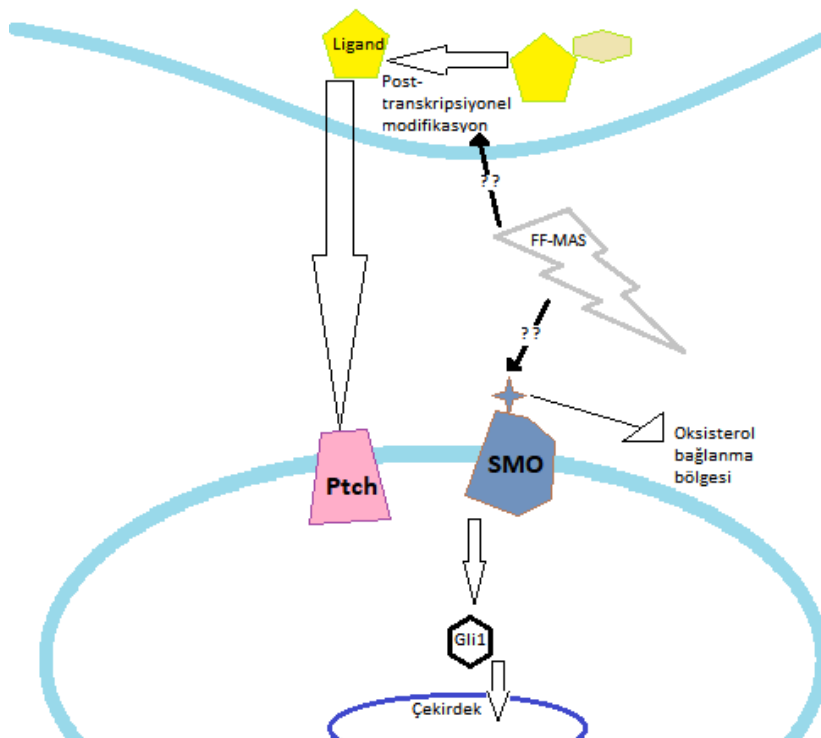
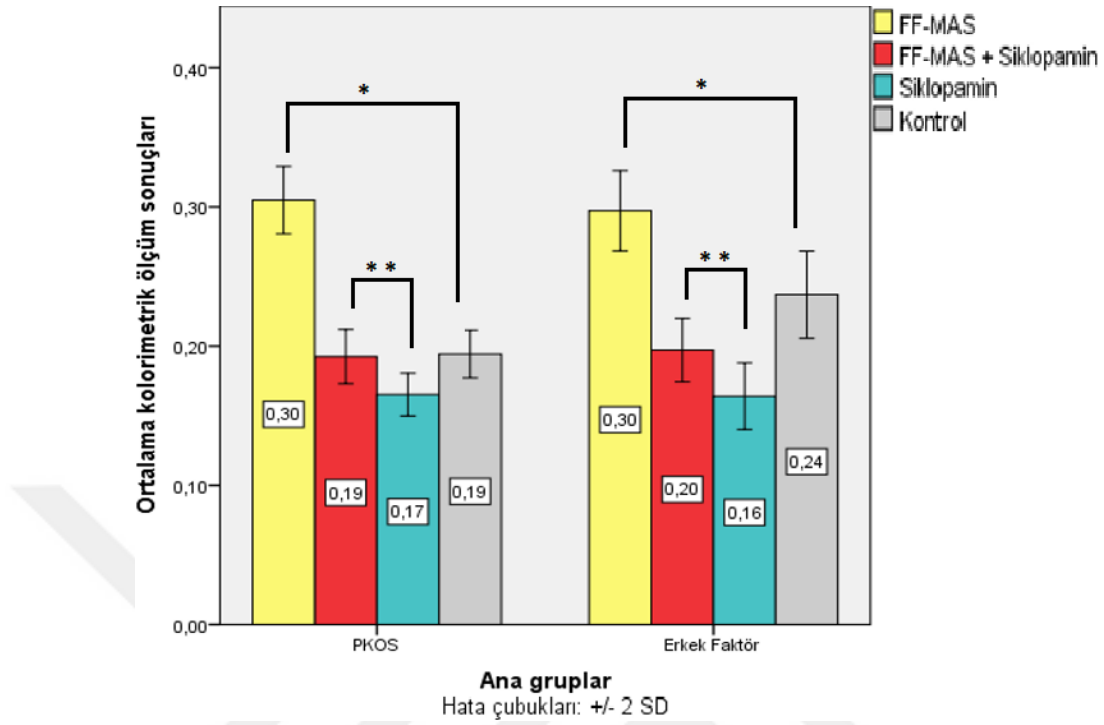
Düz tabanlı 96 kuyulu plaklarda gerçekleştirilen Gli1 immünperoksidaz işaretlemelerin, plak okuyucuda kantitatif kolorimetrik absorbans sonuçlarına göre primer hücre kültürlerine ait granüloza hücrelerinin ve HGL5 hücre hattına ait hücrelerin alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Erkek faktör ana grubunun granüloza hücrelerine FF-MAS verilmesi sonucunda elde edilen Gli1 ekspresyon absorbans ölçümü değerleri, diğer alt gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p<0.001$). FF-MAS + siklopamin alt grubundaki Gli1 ekspresyonu, siklopamin alt grup sonuç farkı anlamsızdı (sırasıyla 0,20 ve 0,16). Kontrol alt grubu, FF-MAS alt grubundan anlamlı olarak düşük, siklopamin alt grubuna oranla anlamlı olarak yüksek Gli1 ekspresyon yoğunluğu ölçülmüştür ($p<0.001$) (Tablo 4.10).

PKOS tanılı hastaların granüloza hücrelerine FF-MAS uygulanması sonrası Gli1 ekspresyon absorbansı, diğer alt gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı miktarda yüksekti ($p\leq 0.001$). PKOS grubunun FF-MAS + siklopamin alt grubu, FF-MAS alt grubundan anlamlı olarak düşük ekspresyona sahipti bunun yanında sadece siklopamin verilen alt gruptan ise anlamlı olmayan miktarda yüksekti (sırasıyla 0,19 ve 0,17). Siklopamin alt grubu, FF-MAS alt grubundan olduğu gibi ($p<0.001$) kontrol alt grubundan da düşük sonuçlar gösterdi ($p<0.001$).

Ana grupların alt grupları kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Her iki ana grubun FF-MAS + siklopamin, siklopamin ve kontrol alt gruplarının Gli1 immünperoksidaz absorbans sonuçları örtüşmekteydi. Ancak kontrol alt grupları karşılaştırması açısından PKOS grubu başlangıç Gli1 ekspresyon absorbansı erkek faktör ana grubunun kontrol alt grubundan daha düşüktü (PKOS kontrol alt grubu ortalama sonucu: 0,19, erkek faktör kontrol alt grubu ortalama sonucu: 0,24). Bu sonuç ile Hh yolağının, PKOS hastalarında daha az ekspresyona sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Tablo 4.9. Ana gruplara ait alt grup sitoELİZA Gli1 ekspresyon ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması (her bir ana grup için n=8).



Şekil 4.16: Tez çalışmasının şekille özetlenmesi. İn vitro FF-MAS verilmesi ile SMO ve Gli1 ifadelerinde yükselme izlenmiştir. FF-MAS in gözlenen bu etkisinin ligand düzenlenmesindeki rolü yada SMO proteinine bağlanması sonucu olabilir.

5. TARTIŞMA

Steroidogenez pek çok hücrenin fonksiyonel aktivite ve proliferasyonu ile ilgili olarak hücre fizyolojisinde önemli role sahiptir. Birçok hücrede adipoz doku, hepatositler ve kaslarda da steroidogenez oluşur. Bu nedenle steroidogenez bozuklukları birçok organ ve dokudaki hücrelerde izlenebilen değişiklikler ile kendini gösterebilir. Foliküler gelişim ve steroidogenez ilişkisi birçok araştırmada yer alarak incelenmiştir. Özellikle steroidogenez bozukluğu ile tanımlanan PKOS hastalığı ve çeşitli organlardaki etkisi özellikle de foliküler gelişim bozukluğu ile infertiliteye yol açması tüm dünyanın önemli sorunlarından biri olarak görülmektedir. Kolesterol steroidogenez için gerekli en önemli steroldür, bu nedenle bir kolesterol türevi olarak seçilen FF-MAS ve granüloza hücreleri *in vitro* olarak incelenmiştir.

FF-MAS, folikül sıvısından elde edilen, folikülogenez ve embriyogenezin ilk basamaklarında proliferatif etkisi olduğu gösterilen bir oksisteroldür (109). İnsan ve hayvan çalışmalarında oosit matürasyonunda olumlu etkisi sebebiyle *in vitro* fertilizasyon tedavilerinde araştırılmıştır (110, 111) ancak FF-MAS'ın hangi moleküler hücre yolağı üzerinden etkisini gösterdiğine dair yeterince bilgiye ulaşılamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda foliküler gelişimin önemli hücreleri olan granüloza hücreleri üzerinde FF-MAS'ın etkisini *in vitro* olarak inceleyerek; sağlıklı ve steroidogenezin bozulduğu PKOS'lu kadınlara ait granüloza hücrelerini karşılaştırdık. Bu amaçla granüloza hücrelerindeki FF-MAS etkisini Hedgehog yolağı bileşenleri üzerinden inceledik.

Hedgehog yolağı ve FF-MAS ilişkisi; araştırmamızda hücre membranındaki oksisterol bağlama bölgesi bulunan Smoothened (SMO) reseptörü ve yolağın son ürünü olan Gli1 proteini ilişkisi ile değerlendirilmiştir. Kolesterol ve esterleri Hedgehog ligandlarının posttranskripsiyonel modifikasyonunda C-terminaline tutunduklarından (112); 20S-hidroksikolesterol, 26H,7O-C ve kolesterol SMO reseptörünün sistinden zengin oksisterol bağlayıcı alanına bağlanarak Hedgehog sinyal yolağını indüklediğinden (25) söz edilmiştir. SMAD-1, SMAD-5, Notch ve fosfatidilinositol 3 kinaz aktivasyonu ile folikülogenezde hücre proliferasyonu ile ilişkisi bilinmektedir ancak üstte belirttiğimiz şekilde FF-MAS'ın etkisini hangi hücre

yolağı üzerinden gösterdiği bilinmemektedir. Oksisterol-Hedgehog yolağı ilişkisi literatürde daha önce gösterildiğinden, araştırmamızda oksisterol türevi olan FF-MAS etkisini hücrede Hedgehog yolağı üzerinden mi gerçekleştirdiği araştırılmıştır.

Folikül büyümesi ve gelişiminde hücre dışı büyüme faktörleri TGF- β ailesi, granüloza hücrelerinden salınan aktivinler, teka hücrelerinden salınan BMP-4 ve BMP- 7 (113), oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15 gibi pek çok faktör preantral ve antral folikül gelişiminde rol oynamaktadır (114). Ancak bizim araştırma konumuz BMP15 gibi FSH reseptöründen bağımsız etkiyle (115) granüloza hücrelerinin proliferasyonundan sorumlu moleküllerden daha farklı olarak, folikül büyümesinin kritik bir belirleyicisi olan FSH reseptörü bulunan granüloza hücrelerinin, oksisterol etkisiyle proliferasyonunda hücre içindeki yollardaki sonuçlardır.

Fare ve insan adrenal korteks çalışmalarında Hedgehog bileşeni Ptch1 ve Gli1'in steroidojenik enzimlerle beraber ekspresyonu gösterilmiştir, Ptch1 ve Gli1 proteinlerinin mutasyonlarında adrenal kortekste hipoplazi izlenmiştir (116, 117). Yine steroidogenezin hormon sentezi açısından önemli rol oynadığı granüloza ve teka hücrelerinde meydana gelen Hedgehog yolağı değişimlerinin, bu hücrelerdeki proliferasyonu ve hormon sentezini etkilediği bildirilmiştir (118, 119). Yaptığımız WST-1 deneyleri sonucunda elde ettiğimiz veriler FF-MAS'ın doz bağımlı olarak granüloza hücre proliferasyonunu etkilediğini göstermiştir. Folikül büyümesinde pekçok açıdan önemli role sahip granüloza hücrelerinin çoğalması ve dolayısıyla preantral-antral foliküllerin gelişimine etkisi görülebilecek FF-MAS'ın bu etkisinin hücre içi mekanizmalarını ortaya koyması nedeniyle araştırmamızda yeni bilgilere ulaşılmış ve literatüre katkı sağlanmıştır.

Polikistik over sendromu (PKOS) tüm dünyada infertiliteye sebep olan endokrin patolojiler içinde en yaygın olanıdır (120). Bu hastalarda azalmış granüloza hücre proliferasyonu ile beraber birçok kistik folikül görülmektedir (121). Bu sebeple PKOS'u inceleyen birçok preklinik ve klinik çalışma literatürde bulunmaktadır ancak hastalığın patofizyolojisi halen tam olarak ortaya konulamamıştır. Çalışmamızda PKOS hastalarının dahil edilmesinin sebebi ele aldığımız FF-MAS oksisterolünün granüloza hücre proliferasyonuna etkisinin bu hastalarda da olup olmadığını ve bu

etkisinin Hedgehog yolağıyla ilişkisini araştırmaktır. Bu nedenle özellikle PKOS gibi foliküler gelişimin bozulduğu, iri kistik yapıların gözleendiği metabolik hastalıklarda granüloza hücrelerinin steroidojenik aktivitelerinin modüle edilmesi kritik öneme sahiptir.

PKOS patogeneğinde bulunan insülin direnci ve sonucunda ortaya çıkan yüksek insülin seviyeleri; teka hücrelerinden yüksek miktarda androjen salgılanmasına sebep olur. Yüksek glukoz seviyesi de seks hormonu bağlayıcı globülin'in (SHBG) karaciğerde üretimini baskılar, dolayısıyla kandaki serbest androjen miktarı artar (122). Steroid sentezini negatif yönde etkileyen bu bozukluklar, oksisterol üretimi ve fonksiyonunu da ilgilendirmektedir. Oksisterol-steroidogenez ilişkisi, oksisterollerin kolesterol üretiminin ara basamaklarını oluşturdıklarından büyük önem taşımaktadır (123). Ayrıca dişi genital sistemin oksisterollerinden olan FF-MAS'in PKOS hastalığının *in-vitro* fertilizasyon tedavisinde oosit maturasyonu açısından ele alınabileceğini öneren çalışmalar da bulunmaktadır (124). Biz de çalışmamızda, *in vitro* olarak FF-MAS ile PKOS tanısı alan hastaların granüloza hücrelerinde, sağlıklı kişilerin granüloza hücrelerine oranla daha iyi cevap vererek, istatistiksel olarak anlamlı hücre artışını saptadık. FF-MAS'in proliferasyona olumlu katkısını gösteren bu sonuçlarımız, FF-MAS oksisterolünün literatürdeki oosit maturasyonuna pozitif yönde etkisini dolayısıyla foliküler gelişime ve dişi fertilesine pozitif yönde katkısının olabileceğini desteklemektedir.

FF-MAS oksisterolünün proliferatif etkisinin hangi hücrel mekanizma üzerinden çalıştığına dair literatür bulunmamaktadır, bu sebeple çalışmamızda oksisterollerle ve dişi genital sistemle ilişkili olan Hedgehog yolağı ve onun bileşenleri ele alınmıştır. Hedgehog yolağı bileşenleri patched reseptörü (PTCH), smoothened reseptörü (SMO) ve son ürün olan transkripsiyon faktörü Gli proteinleridir. SMO oksisterol bağlayıcı bölge içermesi sebebiyle oksisterollerin Hedgehog yolağına etkisini en iyi gösterecek molekül olarak tercih edilmiştir. Gli1 ise Hedgehog yolağının en çok bilinen son ürünü olması, kanonik yolağın uyarılmasını ifade etmesi nedeniyle seçilmiştir. Sağlıklı granüloza hücrelerinde FF-MAS verildiğinde SMO ve Gli1 ekspresyonlarında yükselme izlenmiştir bunun ötesinde

PKOS tanısı alanların granüloza hücrelerinde bu yükselme daha anlamlıdır. Bu da FF-MAS'in önceki çalışmalarda önerildiği gibi PKOS'daki etkisinin önemine katkı sağlamaktadır ve literatüre yeni bir bilgi kazandırmıştır.

Siklopamin bir alkaloid olarak seçici bir Hedgehog yolağı inhibitörüdür ve inhibitör etkisini yolak reseptörü SMO'ya bağlanarak gösterir (125). Araştırmamızda sadece siklopamin verilen alt grupların immünofloresan ve immünperoksidaz sonuçlarının hepsinde en düşük ekspresyon gözlenmiştir. Bu sonuçlar araştırmada kullanılan deney modelinin başarılı olarak gerçekleştirildiğini göstermektedir. Sağlıklı granüloza hücreleri siklopamine maruz kaldığında, SMO ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı düşme göstermiştir. Siklopaminin eklenmesi; SMO ekspresyonu düşürmüş olmakla birlikte tamamen ortadan kaldırmamıştır çünkü siklopamin fonksiyonel inhibisyon yapar, ayrıca mevcutta bulunan moleküllerin degradasyonunu gerçekleştirmek gibi bir etkisi yoktur. Siklopamin SMO'ya bağlanıp yolağı inhibe ederek dinamik şekilde sürekli yapım-yıkım sürecinde olan Hedgehog yolağı bileşenlerinden (126) mevcut SMO'lara bağlanarak yeni protein üretimine etki edip ekspresyon azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle hücrede daha önceden bulunan SMO ekspresyonu düşük miktarlarda da olsa izlenmiştir. Tüm bunların yanı sıra yeni SMO üretiminin engellemesi dikkate alındığında SMO ekspresyonları beklendiği gibi FF-MAS ile birlikte siklopamin verilen alt gruba göre de düşük miktarda saptanmıştır.

Hücre içi Gli1 ekspresyonu da SMO ekspresyonuna benzer şekilde, siklopamin etkisi altında yine çok düşük miktarlarda saptanmıştır. Bunun nedeni parakrin-otokrin etkiyle mevcut Gli1'lerin etkinlik göstermesi olabileceği düşünülmüştür. Böylece Gli1 ekspresyonu siklopamin varlığında da düşük miktarda da olsa görülebilmektedir. Gli1 hücre içi bir protein olarak, daha önceden tanımlanmayan yollarla da uyarılabildiğinden bahseden çalışma bulunmaktadır (127). Ancak araştırmamızın sonuçları SMO ve Gli1 ekspresyon düzeylerinin kanonik yolakla uyumlu şekilde, her iki proteinin de benzer değişimlerini göstermiştir.

FF-MAS ile siklopaminin beraber verildiği alt gruplarda tüm immünofloresan ve immünperoksidaz ekspresyonları birbirleriyle uyumlu olarak sadece FF-MAS

verilen ve kontrol alt gruplarına oranla her iki proteinin ekspresyonlarında anlamlı düşüş saptanmıştır. Hedgehog yolak bileşenleri olan SMO ve Gli1 ekspresyonlarının siklopamin ile baskılanmış olması ancak sadece siklopamin verilen alt gruptan yüksek saptanması; FF-MAS'ın indüktif etkisinin Hedgehog yolağı üzerinden gerçekleşebileceğini ve siklopamine rağmen bu etkinin devam edebileceğini göstermektedir. Bu sonuçlarımıza benzer şekilde, siklopamin ile baskılamanın yapıldığı bir araştırmada HDM/TGF- β 1 uyarısı ile insan bronş epitel hücrelerinde siklopamine rağmen kontrole oranla daha yüksek Hedgehog uyarısı elde edildiği gösterilmiştir (128). Tüm deneylerde, FF-MAS ile siklopaminin beraber verildiği alt gruplarda, sadece siklopamin verilen alt gruplara oranla Hedgehog bileşenlerine etkisi birbirleriyle uyumlu görünse de Gli1 ekspresyonuna baskılayıcı etkisi SMO ekspresyonundan daha fazladır. Bu sonuç da, siklopaminin SMO'yu inhibe ederek, primer olarak Gli1 üretim ve serbestleşmesini engellediğini, ve bu inhibisyonun yeni SMO üretiminden daha fazla olduğunu göstermektedir.

SMO ve Gli1 ekspresyonları hem sadece siklopamin hem de siklopaminle beraber FF-MAS verilen gruplara oranla kontrol alt gruplarında, beklendiği gibi istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar Jozkowiak M. ve ark.'ın belirttiği şekilde granüloza hücrelerinde Hedgehog yolağının eksprese olduğunu ve yolak bileşenlerinin herhangi bir etki olmaksızın eksprese olduğu bilgisini (129) desteklemiştir. Bununla beraber kontrol alt gruplarında, FF-MAS alt grubuna oranla daha düşük proliferasyon oranları ve Hedgehog yolağı bileşenlerinin ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük izlenmiştir. Proliferasyon oranı normale göre daha düşük olduğu Dumesic DA ve Richards JS tarafından belirtilen PKOS hastalarına ait granüloza hücrelerinin (130) bu sonuçları da deney kurgumuzu desteklemektedir. Ayrıca epitel özelliği gösteren granüloza hücrelerinin sağlıklı metabolizmada da prolifere olduklarına işaret etmektedir.

PKOS tanısı alanların granüloza hücrelerinde de benzer SMO ve Gli1 ekspresyon düzeyleri saptanmıştır ancak PKOS ve sağlıklı granüloza hücrelerinin kontrol alt grupları karşılaştırıldığında, PKOS hastalarının granüloza hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar daha düşük ekspresyon

görülmüştür. Araştırmamızın bu sonuçları PKOS hastalarında Hedgehog yolağının daha az etkin olduğunu göstermektedir. PKOS tanısı alanların granüloza hücrelerinin kontrol alt gruplarında daha düşük oranda proliferasyon göstermeleri ve Hedgehog yolağı bileşenleri SMO ve Gli1 ekspresyonlarının sağlıklı granüloza hücrelerine göre istatistiksel anlamlı olmayan şekilde düşük izlenmesi de PKOS'ta Hedgehog yolağının daha az aktif olduğunu gösterir.

PKOS grubunda, FF-MAS ile Gli1 ekspresyon artışı, SMO ekspresyon artışıyla uyumludur. Ancak FF-MAS verilmesi sonrası Gli1 ekspresyon artışı, istatistiksel anlamlı olmasa da SMO ekspresyon artışından bir miktar daha fazla görülmüştür. Bu olgunun sebebi SuFu gibi önceden tanımlanmış Hedgehog yolağıyla ilişkili proteinler (122) ya da henüz tespit edilememiş SMO ve Gli proteinleri arasındaki ilişkide rol alan proteinlerin FF-MAS ile etkileşimleri olabilir.

FF-MAS oksisterolü hem sağlıklı hem de PKOS gruplarında Hedgehog yolağını anlamlı bir şekilde uyarıp; reseptör ve son ürün düzeyinde artışa sebep olmuştur. FF-MAS'ın granüloza hücreleri üstündeki proliferatif etkisinin ve Hedgehog yolak bileşenlerinin beraber artışı, proliferasyonun Hedgehog yolağı üzerinden olabileceğini işaret etmiştir. PKOS tanısı alanların granüloza hücrelerinin FF-MAS'e daha iyi yanıt verdikleri saptanmıştır. Ayrıca Hedgehog yolak bileşenlerinin sağlıklılarda, PKOS hastalarındaki kontrole oranla bir miktar daha yüksek izlenmesi bu yolağın PKOS patogenezindeki rolüne işaret etmiştir. PKOS hastalarının granüloza hücrelerinde Hedgehog yolağının, sağlıklı kadınlara oranla daha düşük miktarda etkinlik gösterdiğini düşündürmektedir. FF-MAS uyarımı sonucu bu azalmış aktivite artarak yolak bileşenleri daha fazla eksprese olmaktadır.

Metabolik bir hastalık olan PKOS patogenezinin, sadece steroidogenez üzerinden değerlendirmenin yetersiz kalabileceği ve diğer metabolik yolakların da rolü olabileceğini düşünmek gerekmektedir. FF-MAS'ın, Hedgehog yolağı dışında MAPK gibi diğer muhtemel yolaklarla iletişimi (108) ya da kanonik olmayan yolak etkileşimleri de bu sonucu ortaya çıkarmış olabilir. Bu konuda FF-MAS etkileşimine dair Hippo, TGF β gibi proliferasyon ve dişi genital sistemle ilişkin diğer hücresel sinyal yolaklarının araştırılması yararlı olacaktır.

Hipotezimizle ilişkin olarak FF-MAS etkinliği, Hedgehog yolağının kanonik yoluyla hem SMO reseptör proteininde hem de Gli1 transkripsiyon faktöründe artışa sebep olur. PKOS grubunda Hedgehog yolak bileşenleri ekspresyonlarındaki yükselme, sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde de gözlemlendiğinden, PKOS patogenezinde sadece Hedgehog sinyal yolağının ya da FF-MAS ile etkileşiminin tek sorumlu olamayacağı sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlarımızın gösterdiği şekilde granüloza hücre proliferasyonunda artış izlenmesi FF-MAS'ın PKOS hastalarının *in vivo* tedavisinde de ele alınabileceğini konu alan yeni çalışmalar planlanmalıdır.



6. SONUÇLAR

1. Primer granüloza hücre izolasyonu ve kültürü; yeni modifiye izolasyon ve kültür protokolü oluşturulmuştur. Lymphosep separasyon sıvısıyla izolasyon; DMEM-F12 bazal medyumuna %5 FBS, %4 l-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin-amfoterisin B eklenerek hazırlanan komplet besiyeri ile hücre kültür sistemi başarıyla kurulmuştur.
2. Sağlıklı ve PKOS tanısı alan kadınların granüloza hücre popülasyonunun ikiye katlanma süresi (*doubling time*) yeni kurulan kültür sisteminde, proliferasyon eğrisi ile 24 saat olarak belirlenmiştir.
3. Sağlıklı ve PKOS tanısı alan kadınların granüloza hücrelerinde *in vitro* 10 mM FF-MAS (ED50) 48saat uygulanmasıyla 1.3 kat proliferatif etki saptanmıştır.
4. Primer granüloza hücrelerinde ve HGL5 hücrelerinde Hedgehog yolak bileşenleri SMO ve Gli1 proteinlerinin ifadesi, immünperoksidaz ve immünofloresan işaretleme yöntemleri kullanarak gösterilmiştir.
5. FF-MAS verilen alt grupların tamamında SMO ve Gli1 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu artış hem sağlıklı hem PKOS hastası hem de HGL5 hücre hattı için geçerlidir. FF-MAS ile granüloza hücre proliferasyonu artışı ile Hedgehog yolak bileşenlerinin artışıdaki korelasyon, FF-MAS oksisterolünün etkisinin Hedgehog yolağı üzerinden olabileceğini göstermiştir.
6. Siklopaminle, Hedgehog yolağının inhibe edildiği tüm alt gruplarda, SMO ve Gli1 ifadeleri diğer tüm alt gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktür. Siklopamin 10 μ M doz ve uygulama yoluyla, granüloza hücrelerinde Hedgehog yolağı inhibisyonu yapmaktadır.
7. FF-MAS oksisterolü ve siklopaminin beraber verildiği alt grupların, sadece FF-MAS verilen alt gruplara ve kontrol alt gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük SMO ve Gli1 ekspresyonuna sahiptir. SMO ve Gli1 ekspresyonu; FF-MAS ile birlikte siklopamin varlığında, sadece siklopamin varlığına oranla daha yüksek ekspresyon gösterir. Bu nedenle, yolak

inhibitörüne rağmen FF-MAS oksisterolünün, Hedgehog yolağı üzerinde uyarıcı etkisi devam eder.

8. İmmünperoksidaz ve immünofloresan ile Hedgehog yolak bileşenleri SMO ve Gli1'in ekspresyonları; FF-MAS uyarısı yada siklopamin inhibisyonu ile sağlıklı ve PKOS da farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık kantitatif sitoELİZA ile de saptanmıştır.
9. PKOS hastalarında granüloza hücrelerinin Hedgehog yolak bileşenleri SMO ve Gli1 ekspresyonları, FF-MAS oksisterolü ile uyarılmadan sağlıklı kadınlara oranla istatistiksel anlamlılık göstermeyen oranda daha düşüktür.
10. PKOS hastalarında granüloza hücrelerinin Hedgehog yolak bileşenleri SMO ve Gli1 ekspresyonları ; FF-MAS uyarısı ile sağlıklı kadınlara oranla istatistiksel anlamlılık göstermeyen oranda daha yüksektir.

7. KAYNAKLAR

1. Pawlina W, Ross MH. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
2. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod. 2004;19(1):41-7.
3. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. Hum Reprod Update. 2014;20(3):334-52.
4. Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C. The Heidelberg screen for pattern mutants of Drosophila: a personal account. Annual review of cell and developmental biology. 2016;32:1-46.
5. Placzek M, Briscoe J. Sonic hedgehog in vertebrate neural tube development. Int J Dev Biol. 2018;62(1-2-3):225-34.
6. Fukuda K, Yasugi S. Versatile roles for sonic hedgehog in gut development. J Gastroenterol. 2002;37(4):239-46.
7. Sasai N, Toriyama M, Kondo T. Hedgehog Signal and Genetic Disorders. Front Genet. 2019;10:1103.
8. Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. Biol Reprod. 2000;63(6):1825-38.
9. Tickle C. How the embryo makes a limb: determination, polarity and identity. J Anat. 2015;227(4):418-30.
10. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. Clin Cancer Res. 2007;13(14):4042-5.
11. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF. A highlight on Sonic hedgehog pathway. Cell Communication and Signaling. 2018;16(1):1-15.
12. Choy SW, Cheng SH. Hedgehog signaling. Vitamins & Hormones. 2012;88:1-23.
13. Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. Front Genet. 2019;10:556.
14. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. Science signaling. 2012;5(246):re6-re.
15. Lee ST, Welch KD, Panter KE, Gardner DR, Garrossian M, Chang C-WT. Cyclopamine: from cyclops lambs to cancer treatment. Journal of agricultural and food chemistry. 2014;62(30):7355-62.
16. Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. Endocrinology. 2005;146(8):3558-66.
17. Spicer LJ, Sudo S, Aad PY, Wang LS, Chun S-Y, Ben-Shlomo I, et al. The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: a novel

role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells. *Reproduction*. 2009;138(2):329-39.

18. Nguyen NT, Lin DP-C, Yen S-Y, Tseng J-K, Chuang J-F, Chen B-Y, et al. Sonic hedgehog promotes porcine oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*. 2009;21(6):805-15.

19. Liu C, Peng J, Matzuk MM, Yao HH-C. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature communications*. 2015;6(1):1-11.

20. Nguyen NT, Lo N-W, Chuang S-P, Jian Y-L, Ju J-C. Sonic hedgehog supplementation of oocyte and embryo culture media enhances development of IVF porcine embryos. *Reproduction*. 2011;142(1):87-97.

21. Griffiths WJ, Wang Y. An update on oxysterol biochemistry: New discoveries in lipidomics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(3):617-22.

22. Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Hearn T, Yutuc E, Morgan AH, Wang Y. Current trends in oxysterol research. *Biochemical Society Transactions*. 2016;44(2):652-8.

23. Mouzat K, Chudinova A, Polge A, Kantar J, Camu W, Raoul C, et al. Regulation of Brain Cholesterol: What Role Do Liver X Receptors Play in Neurodegenerative Diseases? *Int J Mol Sci*. 2019;20(16).

24. Nazih H, Bard JM. Cholesterol, Oxysterols and LXRs in Breast Cancer Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).

25. Griffiths WJ, Wang Y. Oxysterol research: a brief review. *Biochemical Society Transactions*. 2019;47(2):517-26.

26. Grøndahl C. FF-MAS and its role in mammalian oocyte maturation. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2002(41):177-93.

27. Byskov AG, Andersen CY, Leonardsen L. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;187(1-2):189-96.

28. Marin Bivens C, Lindenthal B, O'Brien M, Wigglesworth K, Blume T, Grøndahl C, et al. A synthetic analogue of meiosis-activating sterol (FF-MAS) is a potent agonist promoting meiotic maturation and preimplantation development of mouse oocytes maturing in vitro. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2340-4.

29. L Mescher A. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH. McGraw-Hill Education; 2018.

30. Kierszenbaum AL, Tres L. Histology and cell biology: an introduction to pathology E-book: Elsevier Health Sciences; 2015.

31. Gartner LP. BRS Cell Biology and Histology: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.

32. Lin TC, Wang KH, Chuang KH, Kao AP, Kuo TC. Downregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by bisphenol A in human granulosa cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2020.

33. Teilmann SC. Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Molecular and cellular endocrinology*. 2005;234(1-2):27-35.

34. Moore RK, Erickson GF, Shimasaki S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2004;15(8):356-61.
35. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *The Lancet*. 2007;370(9588):685-97.
36. Azziz R. Polycystic ovary syndrome. *Obstetrics & Gynecology*. 2018;132(2):321-36.
37. Stein IF. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*. 1935;29:181-91.
38. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocrine reviews*. 2016;37(5):467-520.
39. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2016;106(1):6-15.
40. Lizneva D, Kirubakaran R, Mykhalchenko K, Suturina L, Chernukha G, Diamond MP, et al. Phenotypes and body mass in women with polycystic ovary syndrome identified in referral versus unselected populations: systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2016;106(6):1510-20. e2.
41. Yildiz BO, Bolour S, Woods K, Moore A, Azziz R. Visually scoring hirsutism. *Human reproduction update*. 2010;16(1):51-64.
42. Cassar S, Misso ML, Hopkins WG, Shaw CS, Teede HJ, Stepto NK. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp studies. *Human reproduction*. 2016;31(11):2619-31.
43. Zore T, Joshi NV, Lizneva D, Azziz R. Polycystic Ovarian Syndrome: Long-Term Health Consequences. *Semin Reprod Med*. 2017;35(3):271-81.
44. Veltman-Verhulst SM, Boivin J, Eijkemans MJ, Fauser BJ. Emotional distress is a common risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of 28 studies. *Hum Reprod Update*. 2012;18(6):638-51.
45. Salim R, Serhal P. IVF in Polycystic ovary syndrome. *Diagnosis and Management of Polycystic Ovary Syndrome*: Springer; 2009. p. 253-8.
46. Thakre N, Homburg R. A review of IVF in PCOS patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Expert review of endocrinology & metabolism*. 2019;14(5):315-9.
47. de Wilde MA, Lamain-de Ruiters M, Veltman-Verhulst SM, Kwee A, Laven JS, Lambalk CB, et al. Increased rates of complications in singleton pregnancies of women previously diagnosed with polycystic ovary syndrome predominantly in the hyperandrogenic phenotype. *Fertility and sterility*. 2017;108(2):333-40.
48. Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental biology*. 1991;143(1):162-72.
49. Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biology of Reproduction*. 1999;60(3):580-7.

50. El-Hayek S, Yang Q, Clarke HJ. Growth In Vitro of Granulosa Cell–Oocyte Complexes of the Mouse. *Mouse Oocyte Development*: Springer; 2018. p. 1-11.
51. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertility and sterility*. 2013;99(6):1523-33.
52. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of reproduction*. 2003;68(5):1682-6.
53. Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue engineering*. 2006;12(10):2739-46.
54. Desai N, Alex A, AbdelHafez F, Calabro A, Goldfarb J, Fleischman A, et al. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010;8(1):1-12.
55. Brito IR, Lima IM, Xu M, Shea LD, Woodruff TK, Figueiredo JR. Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. *Reproduction, Fertility and Development*. 2014;26(7):915-30.
56. Skory RM, Xu Y, Shea LD, Woodruff TK. Engineering the ovarian cycle using in vitro follicle culture. *Human Reproduction*. 2015;30(6):1386-95.
57. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, et al. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*. 1999;99(7):803-15.
58. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology E-Book: With STUDENT CONSULT Online Access*: Elsevier Health Sciences; 2018.
59. Sadler TW. *Langman's medical embryology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
60. Fietz MJ, Concordet J-P, Barbosa R, Johnson R, Krauss S, McMahon AP, et al. The hedgehog gene family in *Drosophila* and vertebrate development. *Development*. 1994;1994(Supplement):43-51.
61. Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, et al. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature*. 1995;374(6520):363-6.
62. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(22):14037-45.
63. Yue S, Tang L-Y, Tang Y, Tang Y, Shen Q-H, Ding J, et al. Requirement of Smurf-mediated endocytosis of Patched1 in sonic hedgehog signal reception. *eLife*. 2014;3:e02555.
64. Xavier GM, Seppala M, Barrell W, Birjandi AA, Geoghegan F, Cobourne MT. Hedgehog receptor function during craniofacial development. *Developmental biology*. 2016;415(2):198-215.
65. Byrne EFX, Sircar R, Miller PS, Hedger G, Luchetti G, Nachtergaele S, et al. Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature*. 2016;535(7613):517-22.
66. Arensdorf AM, Marada S, Ogden SK. Smoothed regulation: a tale of two signals. *Trends in pharmacological sciences*. 2016;37(1):62-72.

67. Huang P, Nedelcu D, Watanabe M, Jao C, Kim Y, Liu J, et al. Cellular cholesterol directly activates smoothened in hedgehog signaling. *Cell*. 2016;166(5):1176-87. e14.
68. Mastrangelo E, Milani M. Role and inhibition of GLI1 protein in cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 2018;9:35.
69. Iovine V, Mori M, Calcaterra A, Berardozi S, Botta B. One Hundred Faces of Cyclopamine. *Curr Pharm Des*. 2016;22(12):1658-81.
70. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Cyclopamine and hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(20):3418-27.
71. Bale AE, Yu K-p. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Human molecular genetics*. 2001;10(7):757-62.
72. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development*. 2008;22(18):2454-72.
73. Mas C, i Altaba AR. Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(5):712-23.
74. Björkhem I. Rediscovery of cerebrosterol. *Lipids*. 2007;42(1):5-14.
75. Bauman DR, Bitmansour AD, McDonald JG, Thompson BM, Liang G, Russell DW. 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(39):16764-9.
76. Chaudhuri AC, Harada Y, Shimizu K, Gut M, Dorfman RI. Biosynthesis of pregnenolone from 22-hydroxycholesterol. *The Journal of biological chemistry*. 1962;237:703-4.
77. Vaz FM, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2017;56:10-24.
78. Blanc M, Hsieh WY, Robertson KA, Kropp KA, Forster T, Shui G, et al. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity*. 2013;38(1):106-18.
79. Bourre JM, Clément M, Gérard D, Legrand R, Chaudière J. Precursors for cholesterol synthesis (7-dehydrocholesterol, 7-dehydrodesmosterol, and desmosterol): cholesterol/7-dehydrocholesterol ratio as an index of development and aging in PNS but not in CNS. *J Neurochem*. 1990;54(4):1196-9.
80. Berghoff SA, Spieth L, Sun T, Hosang L, Schlaphoff L, Depp C, et al. Microglia facilitate repair of demyelinated lesions via post-squalene sterol synthesis. *Nature neuroscience*. 2021;24(1):47-60.
81. DeLuca HF. Vitamin D: Historical Overview. *Vitam Horm*. 2016;100:1-20.
82. Qian W, Hasegawa J, Cai X, Yang J, Ishihara Y, Ping B, et al. Components of Boiogito Suppress the Progression of Hypercholesterolemia and Fatty Liver Induced by High-Cholesterol Diet in Rats. *Yonago Acta Med*. 2016;59(1):67-80.
83. Ginos BN, Navarro SL, Schwarz Y, Gu H, Wang D, Randolph TW, et al. Circulating bile acids in healthy adults respond differently to a dietary pattern characterized by whole grains, legumes and fruits and vegetables compared to a diet high in refined grains and added sugars: A randomized, controlled, crossover feeding study. *Metabolism*. 2018;83:197-204.

84. Voisin M, de Medina P, Mallinger A, Dalenc F, Huc-Claustre E, Leignadier J, et al. Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(44):E9346-E55.
85. Byskov AG, Baltsen M, Andersen CY. Meiosis-activating sterols: background, discovery, and possible use. *Journal of molecular medicine*. 1998;76(12):818-23.
86. Anderson A, Campo A, Fulton E, Corwin A, Jerome III WG, O'Connor MS. 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox biology*. 2020;29:101380.
87. Yuqin W. 24S, 25-Epoxycholesterol in mouse and rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014.
88. De Medina P, Diallo K, Huc-Claustre E, Attia M, Soulès R, Silvente-Poirot S, et al. The 5, 6-epoxycholesterol metabolic pathway in breast cancer: Emergence of new pharmacological targets. *British Journal of Pharmacology*. 2020.
89. Vejux A, Abed-Vieillard D, Hajji K, Zarrouk A, Mackrill JJ, Ghosh S, et al. 7-Ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochemical pharmacology*. 2020;173:113648.
90. Papadopoulos V, Lecanu L. Caprospinol: Discovery of a Steroid Drug Candidate to Treat Alzheimer's Disease Based on 22R-Hydroxycholesterol Structure and Properties. *Journal of neuroendocrinology*. 2012;24(1):93-101.
91. Björkhem I, Andersson U, Ellis E, Alvelius G, Ellegård L, Diczfalussy U, et al. From brain to bile: evidence that conjugation and ω -hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(40):37004-10.
92. Javitt NB. 26-Hydroxycholesterol: synthesis, metabolism, and biologic activities. *Journal of Lipid research*. 1990;31(9):1527-33.
93. Theofilopoulos S, Griffiths WJ, Crick PJ, Yang S, Meljon A, Ogundare M, et al. Cholestenoic acids regulate motor neuron survival via liver X receptors. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(11):4829-42.
94. Myers BR, Sever N, Chong YC, Kim J, Belani JD, Rychnovsky S, et al. Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothened effector of signal response. *Developmental cell*. 2013;26(4):346-57.
95. Byrne EF, Luchetti G, Rohatgi R, Siebold C. Multiple ligand binding sites regulate the Hedgehog signal transducer Smoothened in vertebrates. *Current opinion in cell biology*. 2018;51:81-8.
96. Liu C, Yang XV, Wu J, Kuei C, Mani NS, Zhang L, et al. Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature*. 2011;475(7357):519-23.
97. Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, et al. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature*. 2011;475(7357):524-7.
98. Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P, et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate α -synuclein fibrilization. *Nature chemical biology*. 2006;2(5):249-53.
99. Karuna R, Holleboom AG, Motazacker MM, Kuivenhoven JA, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, et al. Plasma levels of 27-hydroxycholesterol in humans and

mice with monogenic disturbances of high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. 2011;214(2):448-55.

100. Valenza M, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Fenu S, Jamot L, et al. Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2005;25(43):9932-9.

101. Diekstra FP, Saris CG, van Rheenen W, Franke L, Jansen RC, van Es MA, et al. Mapping of gene expression reveals CYP27A1 as a susceptibility gene for sporadic ALS. *PloS one*. 2012;7(4):e35333.

102. Schüle R, Siddique T, Deng H-X, Yang Y, Donkervoort S, Hansson M, et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in SPG5 patients with hereditary spastic paresis. *Journal of lipid research*. 2010;51(4):819-23.

103. Schöls L, Rattay TW, Martus P, Meisner C, Baets J, Fischer I, et al. Hereditary spastic paraplegia type 5: natural history, biomarkers and a randomized controlled trial. *Brain*. 2017;140(12):3112-27.

104. Björkhem I, Patra K, Boxer AL, Svenningsson P. 24S-Hydroxycholesterol Correlates With Tau and Is Increased in Cerebrospinal Fluid in Parkinson's Disease and Corticobasal Syndrome. *Front Neurol*. 2018;9:756.

105. Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Yutuc E, Roman G, Warner M, Gustafsson J, et al. Concentrations of bile acid precursors in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med*. 2019;134:42-52.

106. Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science*. 2013;342(6162):1094-8.

107. Jamnongjit M, Hammes SR, editors. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Seminars in reproductive medicine*; 2005: NIH Public Access.

108. Guo R, Wang X, Li Q, Sun X, Zhang J, Hao R. Follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS) promotes meiotic resumption via the MAPK pathway in porcine oocytes. *Theriogenology*. 2020;148:186-93.

109. Fakheri RJ, Javitt NB. Autoregulation of cholesterol synthesis: Physiologic and pathophysiologic consequences. *Steroids*. 2011;76(3):211-5.

110. Hao R, Zhang C, Lv L, Shi L, Yue W. Effects of AY9944 A-7 on gonadotropin-induced meiotic resumption of oocytes and development of parthenogenetic embryos in sheep. *Theriogenology*. 2015;83(1):30-7.

111. Marco-Jiménez F, Llobat L, Vicente J-S. Effects of lanosterol on in vitro maturation of porcine oocytes. *Animal reproduction science*. 2010;117(3-4):288-94.

112. Jeong J, McMahon AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(5):591-6.

113. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132(2):191-206.

114. Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(10):1741-50.

115. Shen Q, Chen M, Zhao X, Liu Y, Ren X, Zhang L. Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Syst Biol Reprod Med*. 2020;66(3):176-84.

116. Huang C-CJ, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH-C. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology*. 2010;151(3):1119-28.
117. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(50):21185-90.
118. Finco I, LaPensee CR, Krill KT, Hammer GD. Hedgehog signaling and steroidogenesis. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:105-29.
119. Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking: thematic review series: genetics of human lipid diseases. *Journal of lipid research*. 2011;52(12):2111-35.
120. Rasquin Leon LI MJ. Polycystic Ovarian Disease. *StatPearls [Internet]* 2021 Jan-.
121. Wawrzekiewicz-Jałowicka A, Kowalczyk K, Trybek P, Jarosz T, Radosz P, Setlak M, et al. In Search of New Therapeutics—Molecular Aspects of the PCOS Pathophysiology: Genetics, Hormones, Metabolism and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19):7054.
122. Unfer V, Dinicola S, Laganà AS, Bizzarri M. Altered Ovarian Inositol Ratios May Account for Pathological Steroidogenesis in PCOS. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19).
123. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007;1771(6):663-76.
124. Grøndahl C. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Dan Med Bull*. 2008;55(1):1-16.
125. Galperin I, Dempwolff L, Diederich WE, Lauth M. Inhibiting Hedgehog: An Update on Pharmacological Compounds and Targeting Strategies. *J Med Chem*. 2019;62(18):8392-411.
126. Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I. Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *J Neurobiol*. 2005;64(4):334-56.
127. Kharebava G, Rashid MA, Lee JW, Sarkar S, Kevala K, Kim HY. N-docosaheptaenoylethanolamine regulates Hedgehog signaling and promotes growth of cortical axons. *Biol Open*. 2015;4(12):1660-70.
128. Zou Y, Song W, Zhou L, Mao Y, Hong W. House dust mite induces Sonic hedgehog signaling that mediates epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells. *Mol Med Rep*. 2019;20(5):4674-82.
129. Jozkowiak M, Hutchings G, Jankowski M, Kulcenty K, Mozdziak P, Kempisty B, et al. The Stemness of Human Ovarian Granulosa Cells and the Role of Resveratrol in the Differentiation of MSCs-A Review Based on Cellular and Molecular Knowledge. *Cells*. 2020;9(6).
130. Dumesic DA, Richards JS. Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2013;100(1):23-38.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - **573**

Konu : **ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

Toplantı Tarihi : 12 HAZİRAN 2018 SALI
Toplantı No : 2018/15
Proje No : GO 18/573 (Değerlendirme Tarihi: 12.06.2018)
Karar No : GO 18/573-04

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Lale Karakoç SÖKMENSÜER, Prof. Dr. Gürkan BOZDAĞ ile birlikte çalışacakları ve Dr. Selim ZİRİH'in doktora tezi olan, GO 18/573 kayıt numaralı ve **"FF-MAS Oksisterolünün Folikülogenezdeki Rolünün ve Hedgehog Sinyal Yoluyla İlişkisinin İncelenmesi"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSLI	(Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
KATILMADI			
2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARı	(Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
4. Prof. Dr. Neçdet ~~SAĞLAM~~	(Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan ~~BİNGÖL~~	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELİN	(Üye)
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	17. Av. Meltem ONURLU	(Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)		

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
 06100 Sıhhiye-Ankara
 Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

EK-2. Orjinallik Ekran Çıktısı

Tez versiyon 3

ORJİNALLİK RAPORU

% 8	% 8	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 2
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	avesis.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	acikerisim.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	cv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	avesis.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK-3. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Selim Zırh
 Ödev başlığı: Tez
 Gönderi Başlığı: Tez versiyon 3
 Dosya adı: TEZ_V3_Selim_Z_rh_Hocalar_n_du_zeltmeleri.docx
 Dosya boyutu: 37.01M
 Sayfa sayısı: 105
 Kelime sayısı: 20,350
 Karakter sayısı: 139,077
 Gönderim Tarihi: 29-Nis-2021 04:04AM (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 1572877786

