



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROM MODELİNDE ALFA LİPOİK
ASİT UYGULAMASININ, OVARYAN HİSTOPATOLOJİ, IL-18,
IL-1BETA DÜZEYLERİ VE mRNA EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Eltaf DOĞAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Duygu KUMBUL

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2023-9158 proje numarası ile
desteklenmiştir.
ISPARTA-2024**

BEYAN

“Polikistik over sendrom modelinde alfa lipoik asit uygulamasının, ovaryan histopatoloji, IL-18, IL-1Beta düzeyleri ve mRNA ekspresyonları üzerine etkisi” adlı tıpta uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi SDÜ Tıp Fakültesi Uzmanlık Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgilere ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar dizinine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hazırlayan

Dr. Eltaf DOĞAN

Danışman

Prof. Dr. Duygu KUMBUL

ÖN SÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyimleri ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan, tezimi hazırlama sürecinde her aşamasında bana destek olan, tezimde büyük emekleri olan, mesleki gelişimimde büyük desteğini gördüğüm, Anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Duygu KUMBUL hocama teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatım süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, manevi desteklerini her zaman hissettiren, mesleki gelişimimde büyük katkıları olan sayın Doç. Dr. Fevziye Burcu ŞİRİN, Doç. Dr. İlder İLHAN, Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamdaki katkılarından dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Yusuf TEPEBAŞI hocama teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım tüm asistan ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca manevi destekleri için canım anneme, babama ve abime teşekkür ederim.

Tez döneminde bana olan desteği için Mehmet KIRAN'a teşekkür ederim.

Dr. Eltaf DOĞAN

ISPARTA-2024

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
ÖN SÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1.Amaç.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi ve Menstrual Siklus	3
2.2. Polikistik Over Sendromu.....	5
2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi	5
2.2.2. Epidemiyoloji	5
2.2.3. Patofizyolojisi.....	5
2.2.3.1. Steroidogenez Değişiklikleri.....	5
2.2.3.2. İnsülin Salınımı ve Etki Yolaklarındaki Bozukluklar	7
2.2.3.3. Gonadotropin Mekanizmasında Değişiklikler	10
2.2.3.4. Genetik Faktörler	10
2.2.4. Tanı Kriterleri.....	11
2.2.5. Klinik Bulgular	12
2.2.6. Laboratuvar Bulguları.....	13
2.2.7. Uzun Dönem Metabolik Etkileri.....	15
2.2.7.1. Obezite ve Kardiyovasküler Hastalık Riski	16
2.2.7.2. Kanser ve PKOS İlişkisi	16
2.2.8. İnflamasyon ve PKOS	17
2.3. İnterlökin-1 Beta.....	18
2.4. İnterlökin-18.....	18
2.5. Alfa Lipoik Asit.....	20

2.5.1. Alfa Lipoik Asit Sentezi	21
2.5.2. Metabolik Aktivitesi	21
2.5.3. Emilimi ve Eliminasyonu.....	24
2.2.8. Oksidatif Stres İlişkisi.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1. Gereç.....	26
3.1.1. Deney Hayvanları.....	26
3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	27
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.1.5. Kullanılan Reaktif Malzemeleri	28
3.1.6. Kullanılan Çözeltiler	28
3.1.7. Serum ve Over IL-1 β Düzeylerin Çalışma Prensibi	28
3.1.8. Serum ve Over IL-18 Düzeylerin Çalışma Prensibi	29
3.1.9 Serum Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum Çalışma Prensibi	29
3.1.10. Genetik Analiz için Kullanılan Sarf ve Ekipmanlar	30
3.1.11. Genetik Analiz için Kullanılan Cihazlar	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Deney Prosedürü	31
3.2.1.1. Vajinal Smear Alınması	33
3.2.2. Over Dokusunun Elde Edilmesi.....	36
3.2.3. Serum Numunelerinin Elde Edilmesi	39
3.2.4. Histopatolojik Preparat Hazırlıkları.....	39
3.2.4.1. Doku Örneklerinde Histopatolojik Çalışma.....	39
3.2.4.1.1. Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması	39
3.2.4.2. Örneklerin Histopatolojik Değerlendirilmesi	41
3.2.5. Over Dokusu IL-1 β ve IL-18 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Tayini	41
3.2.5.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	41
3.2.5.1.1. RNA İzolasyonu.....	41
3.2.5.1.2. cDNA Sentezi.....	42
3.2.5.1.3. Primer tasarımı ve hazırlanması.....	44
3.2.5.1.4. Ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi	44
3.2.5.2. Analiz.....	46
3.3. İstatistiksel Analiz	46

4.BULGULAR.....	47
4.1. Serum ve Over İnflamatuvar Sitokinlerin Sonuçları	47
4.2. Over Dokusunda IL-1 β ve IL-18 Ekspresyon Bulguları	48
4.3. Serum Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları	50
4.4. Ortalama Over Ağırılıklarının Sonuçları	50
4.5. Sıçanların Haftalık Vücut Ağırılıklarının Düzeyleri	51
4.6. Over Dokusunun Histopatolojik Bulguları.....	53
5.TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	66
ÖZET.....	68
ABSTRACT	69
KAYNAKLAR.....	70
EKLER.....	80
Ek 1. Etik Kurul Onayı	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
17β-HSD	: 17β-hidroksisteroid dehidrojenaz
3β-HSD	: 3β-hidroksisteroid dehidrojenaz
β-hCG	: β- human koryonik gonadotropin
A4	: Androstenedion
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ALA	: Alfa lipoik asit
AMH	: Anti-Mülleryen hormon
ASRM	: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
CRP	: C-Reaktif Protein
CYP19A1	: Aromataz
CYP450	: Sitokrom p450 enzim kompleksi
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEAS	: Dehidroepiandrosteron sülfat
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DHT	: Dihidrotestosteron
DM	: Diyabetes Mellitus

E1	: Östron
E2	: Östradiol
ELISA	: Enzim-bağlı immünsorbent ölçüm
ESHRE	: İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
FSHR	: FSH reseptörü
GLUT4	: Glukoz taşıyıcı tip 4
GnRH	: Gonadotropin salıcı hormon
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HDL-K	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol
H-E	: Hematoksilen&Eozin
IFN-γ	: İnterferon-γ
IGF1, IGF2	: İnsülinle ilişkili büyüme faktörleri
IGFBP-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
IL-18	: İnterlökin 18
IL-18R	: IL-18 reseptörü
IL-18BP	: IL-18 bağlayıcı protein
IL-1Ra	: IL-1 reseptör antagonisti
ILRAcP	: IL-1 reseptör yardımcı proteini
IL-1R1	: IL-1 reseptör tip1
IR	: İnsülin reseptörü
IRS	: İnsülin reseptör substrat
İp	: İntraperitoneal

K	: Kontrol
KAH	: Konjenital adrenal hiperplazi
KMS	: Karboksi metil selüloz
KoA	: Koenzim A
LDL-K	: Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol
LH	: Luteinize edici hormon
LHCGR	: Luteinize edici hormon/koryogonadotropin reseptörü
LHCRG	: Luteinize edici hormon/koryogonadotropin reseptör
MAPK	: Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz
MİF	: Makrofaj migratuar inhibisyon faktör
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
Nrf-2	: Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
NIH	: Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PDK1/2	: PIP3 bağımlı kinaz 1 ve 2
PI3K	: Fosfotidilinositol 3-kinaz
PIP2	: Fosfotidilinositol-4,5-bifosfat
PIP3	: Fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat
PKOS	: Polikistik over sendromu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
SHBG	: Seks hormonu bağlayıcı globülin
StAR	: Steroidojenik akut regülatuar protein
T	: Testosteron

TAS	: Total antioksidan durum
TG	: Trigliserid
Th1 ve Th2	: Yardımcı T hücre 1 ve 2
TOS	: Total oksidan durum
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör α
TPP	: Tiamin pirofosfat
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
VKİ	: Vücut kitle indeksi
VLDL-K	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal menstrual siklus.....	4
Şekil 2.2. Over steroidogenezi	7
Şekil 2.3. İnsulin sinyal yolları.....	8
Şekil 2.4. İnsulin direncinin etkileri	9
Şekil 2.5. IL-18 etki yolları.....	19
Şekil 2.6. ALA'nın kimyasal yapısı.	20
Şekil 2.7. DHLA'nın kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.8. R-Alfa lipoik asit sentezi.....	21
Şekil 2.9. Pirüvat dehidrojenaz enzim kompleksi	22
Şekil 2.10. ALA'nın antioksidan etkisi	23
Şekil 2.11. ALA'nın çoklu etkisi.....	24
Şekil 2.12. ALA ve DHLA'nın metabolitleri.....	25
Şekil 3.1. Letrozolün kimyasal yapısı.....	27
Şekil 3.2. Deney prosedürü	32

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1. Over dokusunda IL-1 β ve IL-18 relatif mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	49
Grafik 4.2. Deneyin başlangıcında ve her haftanın sonunda ölçülen ortalama vücut ağırlıklarının değişimi.....	52



RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Letrozolün oral gavaj uygulaması	32
Resim 3.2. ALA'nın intraperitoneal uygulaması	33
Resim 3.3. Proöstrus fazı	34
Resim 3.4. Östrus fazı.....	37
Resim 3.5. Metöstrus fazı	37
Resim 3.6. Diöstrus fazı.....	38
Resim 3.7. Sıçan kan alımı	38
Resim 3.8. Tuba uterina ve over dokusu.....	37
Resim 3.9. Tuba uterinadan ayrılmış bilateral over dokuları.....	38
Resim 3.10. Polikistik over görüntüsü.....	38
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait over doku kesiti. Farklı büyüme aşamasındaki foliküller ve medulla gözlenmektedir. KL: Korpus luteum, GF: Graaf folikül PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül (H-E, x40).	56
Resim 4.2. ALA grubuna ait over doku kesiti. Farklı büyüme aşamasındaki foliküller ve medulla gözlenmektedir. PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graaf folikül, KL: Korpus luteum (H-E, x40).	56
Resim 4.3. PKOS grubuna ait over doku kesiti. KF: Kistik folikül. Siyah ok: Nekrotik hücreler, mavi ok: Apoptotik hücre (H-E, x100).....	57
Resim 4.4. PKOS-ALA grubuna ait over doku kesiti. KF: Kistik folikül, KL: Korpus luteum, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül. Siyah ok: Nekrotik hücreler, mavi ok: Apoptotik hücre (H-E, x40).....	57
Resim 4.5. Kontrol grubuna ait over doku kesiti. GF: Graaf folikül, KL: Korpus luteum (H-E x100).	58
Resim 4.6. PKOS-ALA grubuna ait over doku kesiti. KF: Kistik folikül KL: Korpus luteum GF: Graaf folikül (H-E x40).....	58

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Polikistik over sendromu fenotipleri	13
Tablo 2.2. Metabolik sendrom tanı kriterleri.....	15
Tablo 3.1. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı	43
Tablo 3.2. Revers transkriptaz termal döngü protokolü	43
Tablo 3.3. Genler ve genlere ait spesifik primer dizilimleri.....	44
Tablo 3.4. PCR reaksiyon karışımı	45
Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PCR döngüsü	45
Tablo 4.1. Serum ve over dokusunda IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.2. Over dokusunda IL-1 β ve IL-18 mRNA ekspresyon düzeyleri	49
Tablo 4.3. Serum oksidatif stres parametrelerinin sonuçları ve gruplar arası karşılaştırılması.....	50
Tablo 4.4. Ortalama over ağırlıklarının düzeyleri ve gruplar arasında karşılaştırılması	51
Tablo 4.5. Haftalık vücut ağırlık düzeylerinin ortalaması.....	52
Tablo 4.6. Histopatolojik bulguların derecelendirilmesi.....	53
Tablo 4.7. Gruplar arasındaki histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi	55

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınlarda infertilitenin en sık sebebidir. Patogenezi net olarak aydınlatılamamış olsa da genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (1). Stein ve Leventhal 1935 yılında hiperandrojenizm, menstrüasyon bozukluğu, hirsütizm ve polikistik over morfolojisini de içeren bir fenotip olarak hastalığı tanımlamıştır. Bu sebeple PKOS, Stein-Leventhal Sendromu olarak da bilinir (2). PKOS; insülin direnci, tip 2 diyabet, obezite, artmış kardiyovasküler hastalıkların yanında psikolojik bozuklukların da (anksiyete, depresyon vb.) yaygın olarak görüldüğü birçok sistemi etkileyen metabolik bir bozukluktur (3). Yapılan çalışmalarda kronik düşük dereceli inflamasyonun hastalığın gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (4). PKOS ile ilişkili artmış interlökin 18 (IL-18), IL-1beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinler de bu bulguyu desteklemektedir (5). PKOS için henüz standart bir tedavi yöntemi yoktur. İlk basamak tedavi olarak kilo kontrolü önemli bir yer tutmaktadır. Metabolik sendrom için risk faktörü olduğundan dolayı düzenli Hemogloblin A1c (HbA1c) takibinin yanında hipertansiyon ve dislipidemi için de hastalar taranmalıdır. Böylelikle PKOS'a bağlı komorbiditelerin önlenmesi sağlanabilir (6). Kullanılan çeşitli ilaçlar hastalığın semptomlarına ve komplikasyonlarına yöneliktir (7). PKOS, insülin direnci için güçlü bir risk faktörü olduğundan dolayı tedavide en sık kullanılan ilaç metformin uygulamasıdır. Ancak metformin tedavisi, hastalığın karmaşık patogenezi göz önüne alınınca tek başına yeterli değildir. Çeşitli antiinflamatuvar etkili tedavi yöntemleri de ek olarak takviye edilmektedir. Hayvanlarda ve bitkilerde oktanoik asitten sentezlenen alfa lipoik asit (ALA), antiinflamatuvar özelliği nedeniyle PKOS'ta etkili bulunmuştur (8). ALA, Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB)'nin çekirdeğe translokasyonunu engelleyerek proinflamatuvar sitokinlerin salımını engeller (9). Aynı zamanda ALA'nın hem antioksidan etkisi hem insülin duyarlaştırıcı özelliği sebebiyle birçok yönden tedavide etkin olduğu gösterilmiştir (10).

1.1. Amaç

Polikistik over sendromu tedavisinde ALA uygulamasının üreme sistemi ve metabolik yönden iyileştirici etkisi gösterilmiştir (8). Ancak PKOS'ta ALA'nın

etkinliğini araştıran birçok çalışma olmasına rağmen tedavideki rolü ve etki mekanizması net olarak ortaya koyulamamıştır. Bu alışmada, ALA uygulamasının deneysel PKOS oluşturulmuş sıçanların ovayumunda proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , IL-18 düzeyleri ve sentezleri üzerine etkisini incelemek amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

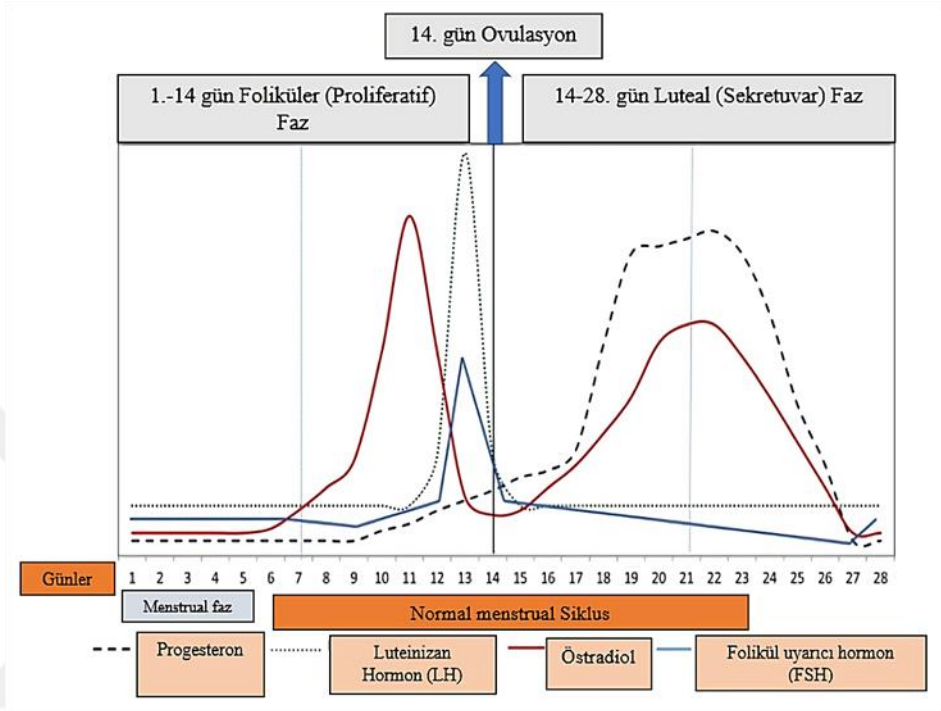
2.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi ve Menstrual Siklus

Temel olarak 3 folikül tanımlanabilir;

- I. Primordial folikül
- II. Gelişmekte olan foliküller (Primer folikül, Sekonder (antral) folikül)
- III. Olgun (Graaf) folikül

Ovaryumun temel işlevi kadın üreme hormonlarının sentezi ve döllenme için gerekli olan olgun oosit üretimidir (11). Ovaryumda folikül gelişimi anne karnında başlar. Gebeliğin 5. haftasında dişi fetüsün ovaryumu yaklaşık 500 ile 1300 civarı primordial germ hücresi bulundurmaktadır. Bu hücreler mitoz bölünmeye uğrar ve gebeliğin 20. haftasında sayıları 6-7 milyona ulaşır (12). Mitoz bölünme tamamlandıktan sonra germ hücreler mayoz bölünme evresine geçerler. Mayoz bölünmenin profaz 1 evresinde duraklayan bölünme süreci sonunda germ hücre kistleri oluşur. Peripartum dönemde, oluşan germ hücre kistleri, bir oosit ve tek katlı granüloza hücre tabakası içeren primordial foliküle dönüşür. Bu süreçte birçok germ hücresi kaybolur ve dişi yaklaşık 1-2 milyon primordial folikül ile doğar. Puberteye gelince primordial folikül sayısı 400-500 bin olacak şekilde geriler (13, 14). Primordial foliküldeki oositin büyümesi, granüloza hücre tabakasının proliferasyonu sonucunda primer folikül meydana gelir. Granüloza hücre tabakası folikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörü eksprese eder. Primer foliküldeki küboidal epitel, çok katlı kolumnar epitele dönüşür. Ayrıca stroması, teka interna ve teka eksterna tabaklarına farklılaşarak sekonder (antral) folikülü oluşturur. Teka interna, luteinize edici hormon (LH) reseptörü eksprese eder. FSH, granüloza hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak folikül gelişimini sağlar. Ayrıca folikülde sıvı dolu boşluklar oluşturur. Bu boşluklara antrum adı verilir. LH, teka interna hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak androjen üretimini sağlar. Bu androjen, ovaryumda bulunan aromataz enzimi ile östrojene dönüşmektedir (15). Artan östrojen düzeyi FSH'yi baskılamaktadır. Büyük bir folikül baskın folikül olarak seçilir ve diğer küçük foliküller azalan FSH seviyesi sebebiyle dejenere olur. Bu büyük folikülde granüloza ve teka hücreleri çoğalarak graaf (olgun) folikül adını alır. Olgun foliküldeki granüloza hücreleri LH reseptörleri eksprese

ederek LH'ye de duyarlı hale gelir. Artan östrojen ve LH piki ile ovulasyon meydana gelir. Ovulasyon sonrası geri kalan yapı korpus luteumdur. Temel olarak progesteron salgılayan korpus luteum, implantasyon gerçekleşmezse korpus albicans adı verilen bağ dokusuna dönüşür (16).



Şekil 2.1. Normal menstrual siklus

17 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. Normal menstrual siklusun fazları ve fazlara göre değişen hormon seviyeleri gösterilmiştir.

Ortalama menstrual siklus 28 gündür. İlk 14 gün foliküler (proliferatif) fazdır. FSH etkisiyle artan östradiol baskın hormondur. Foliküler fazın ortalama ilk 5 günü menstrual fazdır. 14. günde artan östradiol, FSH ve LH uyarımında pozitif etki yapar ve ovulasyon fazı başlar, olgun oosit folikülden atılır. 14-28. günler arası luteal (sekretuar) fazdır. Baskın hormon progesterondur. İmplantasyon gerçekleşmezse progesteron seviyeleri düşer ve menstrual faz başlamış olur (18) (Şekil 2.1).

2.2. Polikistik Over Sendromu

2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi

Polikistik over sendromu, üreme çağındaki kadınlarda sık görülen bir endokrin-metabolik bozukluktur (19). Etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte kesin bir tedavi yöntemi de yoktur (20). 1935'te Irving Freiler Stein ve Michael Leo Leventhal, 4'ü obez olan 7 kadın hasta üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda, amenorenin, polikistik overler sonucu meydana geldiğini bulmuşlardır (21). Amenore, hirsutizm ve polikistik over ilişkisini ilk farkedenden kişiler olmuşlardır. Aynı zamanda bu belirtilerin sebebinin ön-hipofiz hormon kaynaklı olabileceğini de öne sürmüşlerdir (22).

2.2.2. Epidemiyoloji

Polikistik over sendromu, üreme çağındaki kadınların %5 ile %15'ini etkiliyor gözükse bile farklı tanı kriterleri göz önüne alınınca bu oran değişiklik göstermektedir (23). Irk ve etnik kökenlere göre görülme sıklığı da farklıdır. Klinik olarak geniş spektrumlu bir sendrom olmasından dolayı tanı kriterleri yetersiz kalabilmektedir. Dolayısıyla görülme sıklığını etkileyen pek çok faktör olmasından dolayı prevalansı da kesin olarak bilinmemektedir (24).

2.2.3. Patofizyolojisi

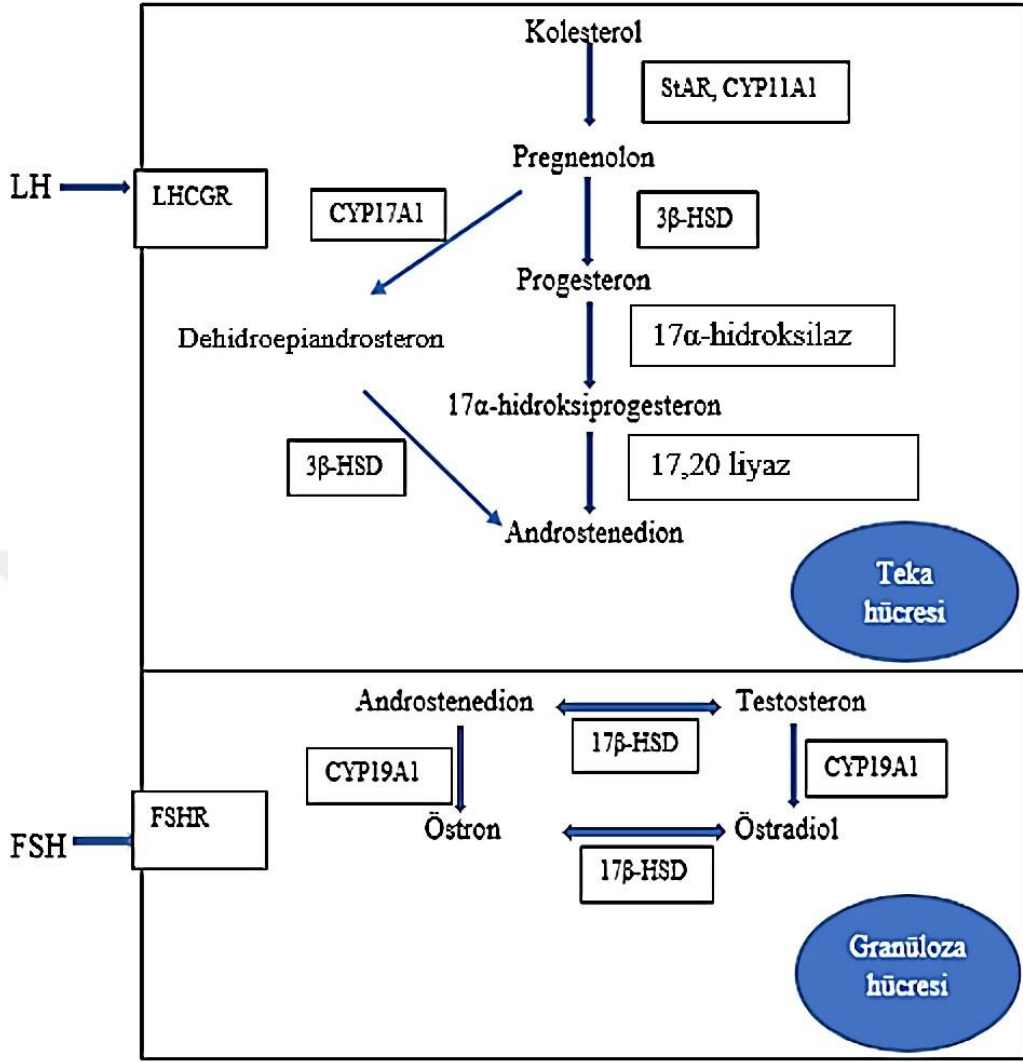
Polikistik over sendromu patofizyolojisinde; steroidogenez değişiklikleri, insülin salınımı ve etki yollarındaki bozukluklar, gonadotropin mekanizmasında değişiklikler ve genetik faktörler öne çıkmaktadır (25).

2.2.3.1. Steroidogenez Değişiklikleri

Steroidogenezin ilk aşaması hücre sitoplazmasından mitokondriye kolesterolün taşınmasıdır. Bu taşıma steroidojenik akut regülatuar protein (StAR) aracılığıyla gerçekleşir. Steroid hormon sentezinde ilk adım kolesterolden pregnenolon oluşumudur. Bu dönüşümden mitokondriyal sitokrom p450 enzim kompleksi (CYP450) alt tiplerinden biri olan CYP11A1 sorumludur (26). Kolesterol

yan zincir kırıcı enzim yada 20, 22 desmolaz enzimi olarak da isimlendirilir (27). Pregnenolon, 17 α -hidroksilaz enzimi ile 17 α -hidroksipregnenolona dönüşür. 17, 20 liyaz enzimi, oluşan bu 17 α -hidroksipregnenolondan dehidroepiandrosteron (DHEA) oluşturur. Bu iki enzim CYP17A1 olarak bilinir. Daha sonra oluşan DHEA, 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (3 β -HSD) enzimi ile androstenediona dönüşür. Androstenedion 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (17 β -HSD) enzimi ile testosterona, aromataz (CYP19A1) ile östrona (E1) dönüşmektedir (Şekil 2.2). Testosterondan, aromataz enzimi ile östradiol (E2) oluşmaktadır. PKOS'da görülen overdeki steroidogenez değişikliklerinden en dikkat çekicisi artmış CYP17A1 aktivitesidir. Bunun sonucu olarak da hiperandrojenik durum ortaya çıkmaktadır (28).





Şekil 2.2. Over steroidogenezi

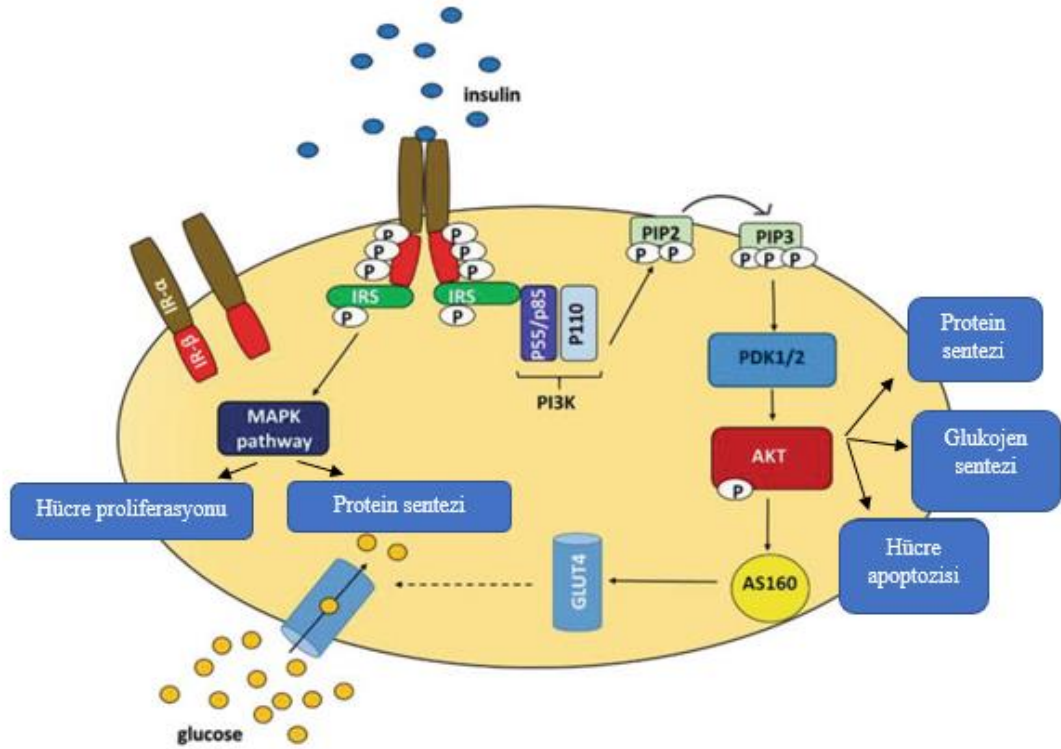
29 numaralı kaynaktan yararlanılarak çizilmiştir.

Ovaryan steroidler, dolaşımdan teka hücrelerine geçen steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ile mitokondriye taşınan kolesterolden sentezlenir. LH, teka hücre membranında bulunan luteinize edici hormon/koryogonadotropin reseptörüne (LHCGR) bağlanarak etki gösterir. FSH, granuloza hücre membranında bulunan FSH reseptörüne (FSHR) bağlanarak etki eder.

2.2.3.2. İnsülin Salınımı ve Etki Yolaklarındaki Bozukluklar

İnsülin, pankreasın β hücrelerinde sentezlenen 51 aminoasitten oluşan peptit yapılı bir hormondur. Esas olarak glukoz regülasyonunda görevli olsada hücrenin

büyümesi ve metabolizması üzerine de birçok etkisi olan anabolik bir hormondur (30, 31). Glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4) aracılığıyla kas ve yağ dokusu gibi hedef dokulara glukoz taşır (32). İnsulin, hücre membranında bulunan reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir. İnsulin reseptörü (IR), disulfid bağıyla birbirine bağlı $\alpha 2\beta 2$ yapısında heterotetramerik membran glikoproteinidir ve tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (33). IR, ayrıca insülinle ilişkili büyüme faktörleri (IGF1 ve IGF2) tarafından da aktive edilebilir (34). İnsulin, reseptörüne bağlandıktan sonra 2 ana yol aktive olur. Bunlar; fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (Akt) yolu ve mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) yoludur. Genel olarak insulinin hücre fonksiyon ve enerji metabolizmasındaki etkileri PI3K/Akt yolu ile olur ve GLUT4'ün hücre membranına translokasyonu gerçekleşir. Protein sentezi ve hücre büyümesindeki etkileri MAPK yolu ile gerçekleşir (35).

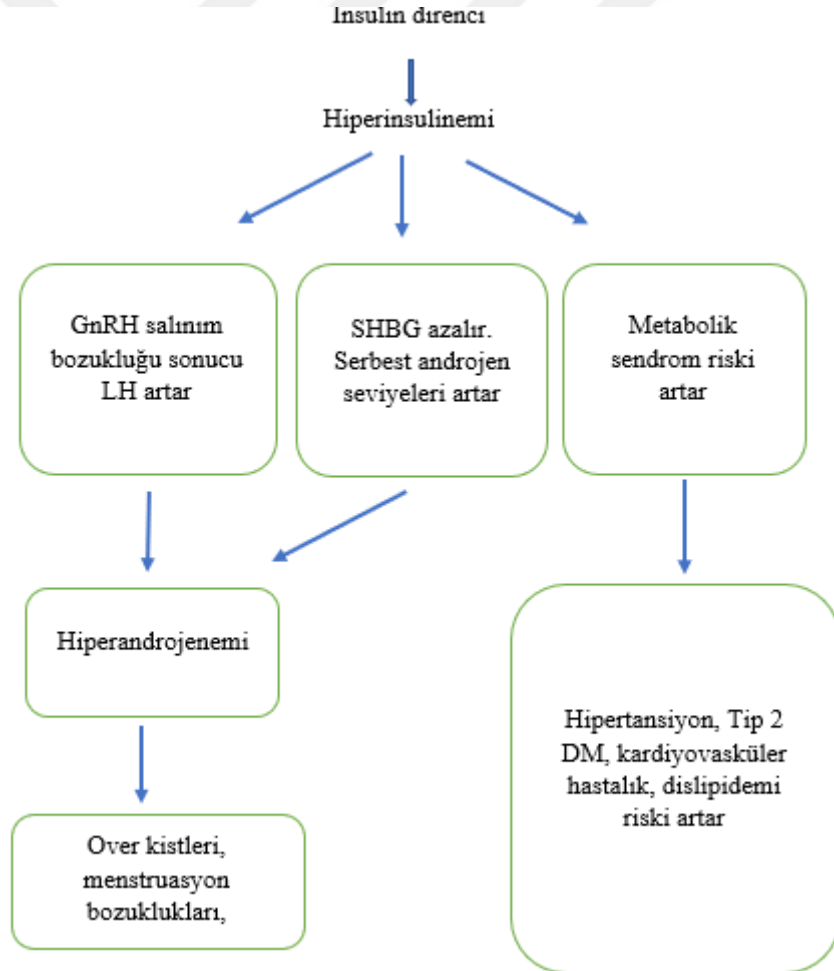


Şekil 2.3. İnsulin sinyal yolları

36 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. IR: İnsulin reseptör, IRS: İnsulin reseptör substrat, PI3K: Fosfoinositid-3 kinaz, PIP2: Fosfotidilinositol-4,5-bifosfat, PIP3: Fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat, PDK1/2: PIP3 bağımlı kinaz 1 ve 2, AKT: Protein kinaz B, AS160: AKT substrat 160 kDa MAPK: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz

İnsulin, insulin reseptörüne (IR) bağlanınca Insulin reseptör substrat (IRS) proteini, tirozinin otofosforilasyonunu tetikler. Ayrıca IRS de fosforillenir ve PI3K ile kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks, fosfotidilinositol-4,5-bifosfat'ı (PIP2) fosforiller daha sonra PIP2, fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) oluşumuna ve PIP3 bağımlı kinaz 1 ve 2 (PDK1/2) aktivitesine neden olur. PDK1/2, AKT'yi fosforilasyon ile aktive eder. Aktivasyon sonucu oluşan AKT substrat 160 kDa (AS160), GLUT4'ün hücre membranına translokasyonunu sağlar ve hücre içine glukoz transportu gerçekleşir.

Polikistik over sendromunda insülin reseptöründe görülen otofosforilasyon bozuklukları ve PI3K/Akt sinyal yolağındaki bozukluklar neticesinde insülin direnci gelişmektedir. MAPK yolu PKOS hastalarında genellikle etkilenmemektedir (37).



Şekil 2.4. İnsulin direncinin etkileri

38 numaralı kaynaktan yararlanılarak çizilmiştir. GnRH: Gonadotropin salıcı hormon, LH: Luteinize edici hormon, SHBG: Seks hormonu bağlayıcı globülin, Tip 2 DM: Tip 2 Diyabetes mellitus

İnsülin direnci, pankreasın β hücrelerinden daha fazla insülin salınmasına neden olur. Hiperinsulinemi, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1) gen transkripsiyonunu baskılar. Serbest IGFBP-1 düzeyinin serumda azalması ile serbest IGF-1 seviyelerinde artış gözlenir. Artan bu IGF-1 seviyeleri, LH ile sinerjistik etki göstererek teka hücrelerinden androjen sentezini arttırır (39). Artan insülin düzeyleri hem LH salınımını hem de adrenokortikotropik hormon (ACTH) seviyesini arttırır. Bunun sonucu olarak hem over kaynaklı hem de adrenal bez kaynaklı androjen sentezi artar. İnsulinin bir diğer etkisi karaciğerden SHBG yapımını azaltmasıdır. Azalan SHBG düzeyleri sonucunda serbest androjen seviyeleri yükselir. Sonuç olarak insülin direnci, hiperandrojenemiye sebep olmakta ve PKOS patofizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır (40).

2.2.3.3. Gonadotropin Mekanizmasında Değişiklikler

Üreme sistemi esas olarak hipotalamus-hipofiz-over aksının normal fonksiyonuna bağlıdır. Bu akstaki bozukluklar çeşitli hormonal problemlere sebep olur. Hipotalamusta GnRH sentezlenir ve bu da ön hipofizden FSH ve LH salınımını uyandır. Bu etki sonucunda overde steroid hormon sentezi ve folikül gelişimi gerçekleşmektedir. GnRH, pulsatil olarak salgılanır. Düşük frekanstaki salınımlar (< 2-3 saate 1 puls) daha çok FSH üzerine etkiliyken, yüksek frekanstaki salınımlar (saatte > 1 puls) LH üzerine etkilidir (41). PKOS'ta GnRH'ın pulsatil salınımı bozulmuştur. Artan GnRH salınım sıklığı özellikle LH'yi, FSH'ye kıyasla daha çok etkilemektedir (42). Artan LH düzeyleri androjen yüksekliğine ve ovuluar disfonksiyona neden olur (43). LH, teka hücrelerine etki ederek androstenedion oluşumunu sağlar. Oluşan androstenedion, granuloza hücrelerinde aromataz enzimi ile östron'a (E1), 17β -hidroksisteroid dehidrojenaz enzimi ile testosterona dönüşür. Oluşan testosteron aromataz enzimi ile östradiol (E2) oluşumunu sağlamaktadır (44). PKOS'ta görülen yüksek östrojen düzeyleri GnRH'ın pulsatil salınımını bozarak kısır bir döngüye sebep olmaktadır (45).

2.2.3.4. Genetik Faktörler

Polikistik over sendromu ile ilgili yapılan çalışmalarda, PKOS'lu hastaların annelerinde de %40 bu sendromun olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu sonuç genetik

faktörlerin PKOS oluşumuna etkisini akla getirmektedir (46). Temel olarak PKOS oluşumunda, steroidogenezde yer alan genler, gonadotropin salgılamasını düzenleyici genler, insulin salgılanmasında etkili genler ve diğer genler (obezite ile ilişkili (FTO) genler, PCOS-1 geni, steroid 5- α redüktaz (SRD5A) genleri) ön plana çıkmaktadır (47). Özellikle PKOS'lu hastalarda artmış CYP17A1 gen ekspresyonu androjen hormon sentezini artırır. Gonadotropin salgılanmasını düzenleyici genlerden luteinize edici hormon/koryogonadotropin reseptör (LHCRG) geninde aktive edici mutasyonlar PKOS'ta görülebilmektedir. İnsulin reseptör (INSR) geninde meydana gelen tirozin kinaz alanındaki mutasyonlar PKOS'ta insülin direnci oluşumunda etkisi olan genetik nedenlerdendir.

2.2.4. Tanı Kriterleri

Polikistik over sendromu için kabul edilen ilk tanı kriteri 1990 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından belirlenen kriterlerdir. Bu kriterler;

1.Kronik anovulasyon.

2.Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları (diğer nedenler elimine edilecek) (48).

2003 yılında Hollanda'nın Rotterdam kentinde hem Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) hem de Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) tarafından düzenlenen bir konferansta yeni kriterler belirlendi.

2003 Rotterdam Kriterleri;

1. Oligo-anovülasyon.

2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları.

3. Polikistik overlerin görülmesi ve diğer etiyolojik nedenlerin ekarte edilmesi.

Polikistik over sendromu tanısı için bu 3 kriterden en az ikisinin bulunması gerekir (49). Androjen Fazlalığı ve PKOS (AE-PCOS) Derneği 2006 yılında bu sendrom için klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizmin başlıca kriter olarak

kabul edilip bunun yanında oligo-anovulasyon ve/veya polikistik over morfolojisinden en az birinin olması gerektiğini öne sürmüştür (50).

2.2.5. Klinik Bulgular

Polikistik over sendromunda ovulatuvar disfonksiyon, hiperandrojenizm bulguları ve polikistik over morfolojisi en sık görülen klinik belirtilerdir. Yetişkin bir kadında menstruasyon döngüsü 21-35 gün aralığında olup ortalama 28 gündür. PKOS'lu hastalarda menstruasyon bozukluğu tipik olarak oligomenore (>35 gün arayla sikluslar veya yılda <8 siklus) yada amenore (oligomenore zemininde menstruasyonun takip eden 3 siklus görülmemesi yada önceden düzenli menstruasyon döngüsüne sahip kadında 6 ay menstruasyon kanamasının görülmemesi) olarak karşımıza çıkmaktadır (51). Polimenore (<21 gün arayla meydana gelen sikluslar) PKOS'lu hastalarda daha az beklenen bir durumdur (52). Düzensiz menstruasyon döngüleri ovulatuvar disfonksiyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ovulatuvar disfonksiyon menarştan 1 sene sonra değerlendirilir. Menarştan itibaren 1. senesini doldurmuş kadınlarda 3 seneye kadar olan sürede menstruasyon döngüsü 21 günden kısa veya 45 günden uzun; menarştan itibaren 3 sene geçmiş kadınlarda ise döngünün 21 günden kısa veya 35 günden uzun sürmesi ovulatuvar disfonksiyonun klinik göstergesidir. Klinik hiperandrojenizmin en sık görülen bulguları hirsütizm, androjenik alopesi ve aknedir. Hirsütizm değerlendirilmesinde klinikte modifiye Ferriman Gallwey skoru kullanılır. Androjenik alopesi için Ludwig görsel skoru kullanılırken akne için belirli bir skorlama mevcut değildir (53). Biyokimyasal hiperandrojenemide, serum androjenik hormon seviyeleri yüksektir (54). Rotterdam kriterlerine göre çapı 2-9 mm olan 12 veya daha fazla folikül veya her iki over için >10 cm³ over hacmi olması polikistik over morfolojisinin bir göstergesidir (55). AE-PCOS derneği 2014 yılında yeni bir öneride bulunmuştur. Buna göre her bir over için ≥20 folikül ve/veya ≥10 cm³ over hacmi olması polikistik over morfolojisinin göstergesidir (56). 2018 yılında Uluslararası PKOS Değerlendirmesi ve Yönetimi Kanıtı Dayalı Kılavuzlar tarafından her bir over başına ≥25 folikül ve/veya ≥10 cm³ over hacmi olması polikistik over morfolojisinin göstergesi olarak önerilmiştir. Gelişen ultrasonografi teknikleri sonucu folikül sayısındaki bu farklı önerilerin ortaya

çıkacağı söylenebilir (23). PKOS bu klinik belirtilere göre 4 farklı fenotipe ayrılmıştır (Tablo 2.1) (57).

Tablo 2.1. Polikistik over sendromu fenotipleri

	Hiperandrojenizm	Ovulatuvar disfonksiyon	Polikistik over morfolojisi
Fenotip A	+	+	+
Fenotip B	+	+	-
Fenotip C	+	-	+
Fenotip D	-	+	+

Fenotip A, tip 1 klasik PKOS olarak da adlandırılır ve en sık görülen formdur. PKOS hastalarının yaklaşık %60'ı bu fenotiptedir. Fenotip B, tip 2 klasik PKOS olarak da isimlendirilir ve PKOS hastalarının %8,4'ünü oluşturmaktadır. Fenotip C (ovulatuvar PKOS) ve Fenotip D (normoandrojenik PKOS) daha az sıklıkla görülen diğer formlardır (58). Fenotip A ve B, Fenotip C ve D'ye göre daha yüksek metabolik hastalık riski ile ilişkilendirilmektedir (59).

2.2.6. Laboratuvar Bulguları

Kadınlarda dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), dehidroepiandrosteron (DHEA), androstenedion (A4), testosteron (T) ve dihidrotestosteron (DHT) olmak üzere 5 çeşit androjen hormonu bulunmaktadır. DHEAS üretiminin neredeyse tamamı adrenal bez tarafından sentezlenmektedir. DHEA üretiminin %50'si adrenal bez, %20'si over geri kalan %30'u DHEAS kaynaklıdır. Androstenedion ve testosteron üretiminin %50'si adrenal bez, %50'si over kaynaklıdır. Biyolojik olarak en aktif olan DHT ise karaciğer, yağ dokusu gibi periferik dokularda, testosterondan 5-alfa redüktaz enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir. Biyolojik aktivitelerine göre $DHT > T > A4 > DHEA > DHEAS$ olmasına rağmen serum konsantrasyonları tam tersidir ($DHEAS > DHEA > A4 > T > DHT$) (60). Testosteronun %66'sı seks hormonu bağlayıcı globüline (SHBG), %33'ü albümine bağlanırken geri kalan %1'i serbest formdadır. Testosteron ve DHT'nin biyolojik aktivitelerinden serbest formları sorumludur (61).

Polikistik over sendromu hastalarında hiperandrojenemiden esas olarak over kaynaklı androjenler sorumlu olsada %30 hastada adrenal bez kaynaklı androjen üretimi de artmıştır (62). İnsulin direnci indeksi HOMA-IR; açlık glukoz düzeyi (mg/dl) x açlık insülin düzeyi (μ IU/ml) / 405 formülüne göre hesaplanır ve $>2,5$ olması insülin direncini gösterir (63). Metabolik hastalıklar için bir risk faktörü olan PKOS, insülin direncinin çok sık görüldüğü bir hastalıktır. Artan insülin düzeyleri, karaciğerden SHBG üretimini azaltır. Dolayısıyla biyolojik olarak aktif olan serbest testosteron düzeylerini arttırarak hiperandrojenemiye katkı sağlar (64). Laboratuvar bulgusu olarak PKOS'ta %40 ile %70 hastada DHEAS artarken, %20 hastada A4 ve DHEA seviyeleri yüksek bulunmuştur. Total testosteron seviyesi PKOS'ta yüksek olmasının yanında tek başına değerlendirilmesi önerilmemektedir. Serbest androjen indeksi (FAI); total testosteron (nmol/L) / SHBG (nmol/L) x 100 formülüne göre hesaplanan bir parametredir. PKOS'ta biyokimyasal hiperandrojenizm tanısı için önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda PKOS'ta FAI, kontrollere göre yüksek bulunmuştur (65). İnsulinin bir diğer etkisi LH salınımını arttırmasıdır (66). LH/FSH ≥ 2 olması PKOS'u düşündürsede sensitivite ve spesifitesi düşüktür (67). PKOS'lu hastaların %5 ila %30'unda hafif hiperprolaktinemi bulunsa da bu genellikle geçici bir yüksekliktir. Prolaktin normalin üst sınırının yalnızca %50 üzerindedir (68, 69). Tanı için öncelikle PKOS ile karışabilecek diğer hastalıkların ekarte edilmesi gerekmektedir. Öncelikle serum yada idrarda β - human koryonik gonadotropin (β -hCG) testi yapılarak gebelik tanısı dışlanmalıdır. En sık karışan hastalık konjenital adrenal hiperplazidir (KAH) ve serum 17-OH progesteron düzeyleri ölçülmelidir. Hipotiroid tanısını dışlamak için tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyesi ölçülmelidir. Cushing sendromu ayırıcı tanısı için 24 saatlik idrarda kortizol düzeyi, deksametazon supresyon testi uygulanabilir. Prolaktinoma ile PKOS ayırıcı tanısı için serum prolaktin düzeyleri ölçülür (70). Oligo-anovulasyon nedeniyle PKOS'lu hastalarda serum progesteron seviyeleri düşüktür (71). PKOS'ta östrojen konsantrasyonu genellikle artmış olması beklenir (72). Dislipidemi, PKOS hastalarında kardiyovasküler hastalıkları arttıran bir risk faktörüdür. Bu hastalarda yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-K) azalırken, trigliserid (TG) ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) artmıştır (73). Anti-Mülleryen hormon (AMH), sekonder foliküllerin granüloza hücreleri tarafından salgılanır ve dominant folikül seçiminde önemli bir role sahiptir.

Antral folikül sayısı ile AMH arasında korelasyon vardır. PKOS tanısı için artmış AMH seviyeleri iyi bir göstergedir (74).

2.2.7. Uzun Dönem Metabolik Etkileri

Polikistik over sendromu, metabolik sendrom riskini artırmakta ve Tip 2 DM, kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilmektedir (75). PKOS'lu kadınların yaklaşık %43'ünde, ergenlik çağındaki PKOS'lu gençlerin üçte birinde metabolik sendroma rastlanmaktadır (76).

Tablo 2.2. Metabolik sendrom tanı kriterleri

Ölçüm	Kesme değerler
Artmış bel çevresi	Topluma ve ülkeye özgü tanımlama
Trigliserid yüksekliği ya da hipertrigliseridemi için ilaç kullanıyor olmak	≥ 150 mg/dl
Düşük HDL-K yada düşük HDL-K için ilaç kullanıyor olmak	Erkek <40 mg/dl Kadın <50 mg/dl
Yüksek kan basıncı ya da hipertansiyon için ilaç kullanıyor olmak	Sistolik kan basıncı ≥ 130 mmHg ve/veya Diyastolik kan basıncı ≥ 85 mmHg
Yüksek açlık glukozu ya da hiperglisemi için ilaç kullanıyor olmak	≥ 100 mg/dl

Tanı için Tablo 2.2'de verilen risk faktörlerinden en az 3 tanesinin olması gerekmektedir (77). Dislipidemiye bağlı olarak PKOS'lu hastalarda TG, LDL-K, çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (VLDL-K) artarken, HDL-K seviyeleri

düşüktür (78). PKOS'ta renin-anjiotensin-aldosteron aktivitesinin artması sonucunda hipertansiyon meydana gelebilmektedir (79). PKOS'lu hastaların %35'inde bozulmuş glukoz toleransı görülürken %7,5-10'unda Tip 2 DM görülmektedir (80).

2.2.7.1. Obezite ve Kardiyovasküler Hastalık Riski

Vücut kitle indeksi (VKİ), vücut ağırlığının kilogram (kg) cinsinden değerini, boy uzunluğunun metrekaare (m²) cinsinden değerine bölünmesiyle hesaplanır. VKİ, 25 ile 29,9 kg/m² ise fazla kilolu, ≥ 30 kg/m² ise obez olarak sınıflandırılır (81). Metabolik sendromun önemli bir kriteri olan obezite, PKOS'lu kadınlarda çok sık görülmektedir. Obezite, aynı zamanda insülin direnci riskini de artırır. PKOS'lu hastalarda artan androjen seviyeleri, yağ dokuda aromataz enzimi ile östrojenlere dönüşmektedir. Artan anormal östrojen düzeyleri GnRH salınım bozukluğuna sebep olup ovulatuvar disfonksiyonu tetikler. Dolayısıyla obezite, infertilite için en önemli risk faktörlerinden biridir (82). PKOS'ta görülen infertilite için ilk basamak tedavi diyet ve egzersizdir. İnfertilitesi olan PKOS'lu kadınlarda mevcut vücut ağırlığının %10 kaybı, gebe kalmayı kolaylaştıran bir faktördür (83). İnfertilitenin medikal tedavisinde, ovulasyon indükleyici olarak klomifen sitrat kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda hem yaşam tarzı değişikliği hemde klomifen sitrat kullanımının, tek başına klomifen sitrat kullanımına göre gebelik şansını daha fazla artırdığı gösterilmiştir (84). PKOS, kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde risk faktörüdür. Özellikle ateroskleroz, anjina pectoris ve miyokard infarktüs (MI) riski sağlıklı kadınlara göre PKOS'lu kadınlarda daha yüksektir (85).

2.2.7.2. Kanser ve PKOS İlişkisi

Polikistik over sendromunun yüksek prevalansı göz önüne alınınca, maligniteler için bir risk faktörü olması halk sağlığı için önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle hastalığın seyrinde anovulatuvar sikluslar, karşılanmamış yüksek östrojen düzeyleri, artmış androjen seviyeleri sonucu bu hormonların etki ettiği organlarda malignite riski de artış gösterebilir (86). Anovulatuvar sikluslar nedeniyle gerçekleşmeyen ovulasyon sonucunda korpus luteum oluşamaz. Dolayısıyla PKOS'ta progesteron seviyeleri düşüktür. Bu durum progesteron ile karşılanmamış yüksek östrojen seviyelerine neden olur. Artan östrojen,

özellikle endometrium hiperplazisine sebep olmaktadır. Bu da endometrium kanseri için bir risk faktörüdür (87). PKOS'ta endometrium kanseri görülme riski %9'dur. Ancak genellikle bu kanser iyi prognoza sahiptir (88). PKOS'un meme ve over kanseriyle ilişkisi kesin olarak gösterilememiştir (89).

2.2.8. İnflamasyon ve PKOS

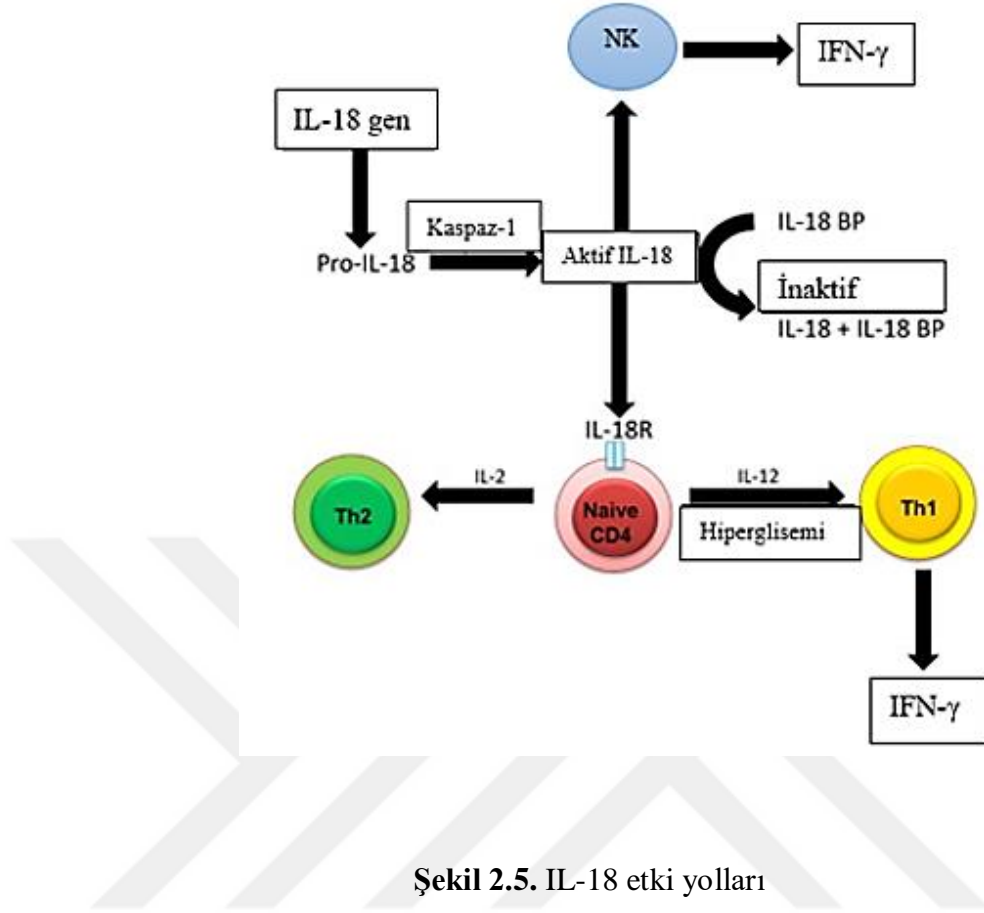
Sitokinler, hücreler arası iletişimde ve bağışıklıkta rol alan belirli immun sistem hücreleri tarafından sentezlenen peptid veya glikoproteinlerdir. Sitokinler ayrıca steroidogenez, folikül gelişimi ve ovulasyonda da rol oynarlar. Proinflamatuvar etkili ve antiinflamatuvar etkili sitokinler sağlıklı kişilerde denge halinde bulunmaktadır. PKOS'ta bu denge bozularak proinflamatuvar sitokinler artış gösterir. Dolayısıyla artan proinflamatuvar etkili sitokinler kronik düşük dereceli inflamasyona neden olmakta ve hastalığın gelişiminde rol almaktadır (90). PKOS'ta inflamatuvar sitokinlerden IL-17, IL-33, IL-6, IL-1, IL-18 ve tümör nekrozis faktör α (TNF- α) seviyeleri artarken antiinflamatuvar etkili olan IL-10 seviyesi azalmıştır (90). PKOS'ta hipernadrogenizmin indüklenmesinin bir nedeni de inflamasyondur. Proinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle androjen üretiminden sorumlu CYP17 enzim aktivitesi artar (91). İnflamatuvar sitokinlerin bir diğer kaynağı da yağ dokudur. Obeziteye bağlı olarak hipertrofiye uğrayan yağ hücrelerinden proinflamatuvar sitokin salınımı gerçekleşir. Aynı zamanda obezite hem insülin direnci hem androjen seviyelerinin artışına sebep olarak kısır bir döngüye neden olur (92). C-Reaktif Protein (CRP), inflamasyon durumlarında artan bir akut faz reaktanıdır. PKOS hastalarında artan seviyeleri sistemik inflamasyonu gösterir (93). Makrofaj migratuvar inhibisyon faktör (MIF), proinflamatuvar etkili bir faktördür. Diğer sitokinlerden farklı olarak ön hipofiz hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre sitoplazmasında depolanır. PKOS'ta MIF seviyeleri artmış olarak bulunur (94). PKOS'ta artan androjen seviyeleri NOD benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3) aktivasyonuna neden olmaktadır. NLRP3 aktivasyonu kaspaz 1'in aktivasyonu ile sonuçlanır ve IL-1 β , IL-18 sentezi gerçekleşmektedir. Artan bu proinflamatuvar sitokinler, over steroidogenezini ve folikül gelişimini bozarak etki etmektedir (95).

2.3. İnterlökin-1 Beta

İnterlökin-1 ailesi temel olarak IL-1a, IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonistinden (IL-1Ra) oluşmaktadır (96). IL-1 β proinflatuar bir sitokindir. Esas olarak aktive edilmiş makrofajdan inaktif öncü bir peptid olan proIL-1 β olarak sentezlenir. Kaspaz 1 (IL-1 β dönüştürücü enzim) ile aktif IL-1 β 'e dönüşür. IL-1 β , etkisini reseptörüne bağlanarak gösterir. IL-1 β reseptörü, IL-1 reseptör yardımcı proteini (ILRAcP) ve IL-1 reseptör tip1'den (IL-1R1) oluşmaktadır (97, 98). PKOS'ta artan bu sitokinler aynı zamanda hastalığın gelişiminde de etkilidir (99). IL-1 β , PKOS'ta özellikle foliküler fazda FSH reseptörünün ekspresyonunu inhibe eder ve folikül gelişimini engeller. Ayrıca granuloza hücrelerinde bulunan aromataz enzimini inhibe ederek androjen seviyelerini artırırken östrojen seviyelerini ise azaltıcı etki gösterir (100). IL-1 β 'nın önemli bir etkisi de glukoz metabolizmasındaki düzenleyici rolüdür. İnsulinin, glukoz alımına bağlı sekresyonunu sağlar. Ancak metabolik sendrom gibi durumlarda kronik olarak uyarılan IL-1 β , pankreatik β hücrelerinin fonksiyonunu bozarak Tip2 DM oluşumuna neden olmaktadır (101).

2.4. İnterlökin-18

İnterlökin-18, ilk olarak 1990 yılında keşfedilmiştir. İnterferon- γ (IFN- γ) indükleyici faktör olarak bilinen proinflatuar bir sitokindir (102). IL-1 ailesinin bir üyesidir. Monosit, makrofaj ve yağ dokusu hücrelerinden öncelikle inaktif pro IL-18 olarak sentezlenir. Aynı IL-1 β 'da olduğu gibi kaspaz-1 ile aktif IL-18'e dönüşür (103). IL-18, etkisini IL-18 reseptörüne (IL-18R) bağlanarak gösterir. Artan IL-18 seviyeleri, IL-18 bağlayıcı protein (IL-18BP) sentezini uyarır. Oluşan bu kompleks sonucu IL-18 inaktif hale geçer ve kontrolsüz doku hasarı engellenmiş olur. IL-18, yardımcı T hücre 1 ve 2 (Th1 ve Th2), doğal öldürücü (NK) hücrelerine etki ederek hem doğal hem de edinsel bağışıklık sistem hücrelerinde etkilidir. NK hücrelerini doğrudan indükleyerek, Th1 hücrelerine de IL-12 ile sinerjistik etki ederek IFN- γ üretimini sağlar. IL-2 ile birlikte Th1 hücrelerini de uyarır (104, 105) (Şekil 2.5).

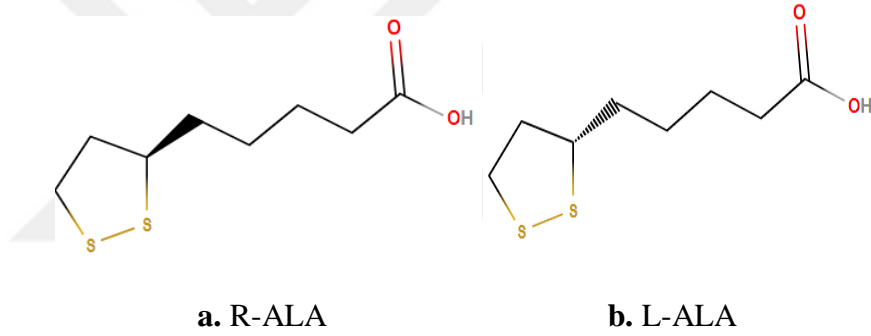


105 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. NK: Doğal öldürücü hücre, IFN- γ : İnterferon- γ , IL-18 BP: IL-18 Bağlayıcı protein, Th1: Yardımcı T hücre 1, Th2: Yardımcı T hücre 2, IL-18R:IL-18 reseptörü, Naive CD4: Olgunlaşmamış CD4.

İnterlökin-18 insülin direnci, metabolik sendrom ve obezite ile ilişkilidir. Kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalitenin iyi bir göstergesidir ve PKOS'lu hastalarda konsantrasyonu yükselir (106). Artan bu IL-18 düzeyleri, infertilitenin bir nedenidir. Aşırı kilolu PKOS'lu hastalarda, normal kilolu PKOS'lu hastalara göre IL-18 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur (107). Over karsinomlarında, normal over dokusuna göre IL-18 gen ekspresyonu anlamlı artış göstermiştir (108).

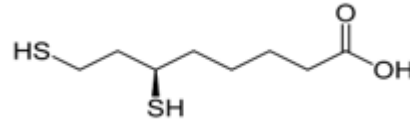
2.5. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit, 1951 yılında biyokimyacı Lester Reed tarafından, karaciğer dokusunda yaptığı bir çalışma sonucu keşfedilmiştir. 1,2 ditiyolan-3 pentanoik asit veya tiotik asit olarak da bilinir. Hem yağda hem suda çözünebilmesi önemli bir özelliğidir. ALA, 8 karbon ve 2 kükürt atomundan oluşur. Asimetrik karbon atomuna sahiptir ve 2 optik izomeri bulunur. Bunlar; sağa dönüşlü ALA (R-ALA, +ALA), sola dönüşlü ALA (L-ALA, -ALA) olarak isimlendirilir (Şekil 2.6). Doğal formu kofaktör olarak işlev gören R-ALA'dır. Sentetik ALA ise hem R-ALA hem L-ALA'yı içeren rasemik bir karışımdır (109, 110). Redükte formu dihidrolipoik asit (DHLA) olarak adlandırılır. ALA da 6. ve 8. pozisyonundaki kükürt atomları halka yapmış şekildedir. DHLA'da ise bu halka yapısı yoktur ve kükürt atomları sülfhidril şeklindedir (111) (Şekil 2.7).



Şekil 2.6. ALA'nın kimyasal yapısı.

R-ALA: Sağa dönüşlü alfa lipoik asit, L-ALA: Sola dönüşlü alfa lipoik asit

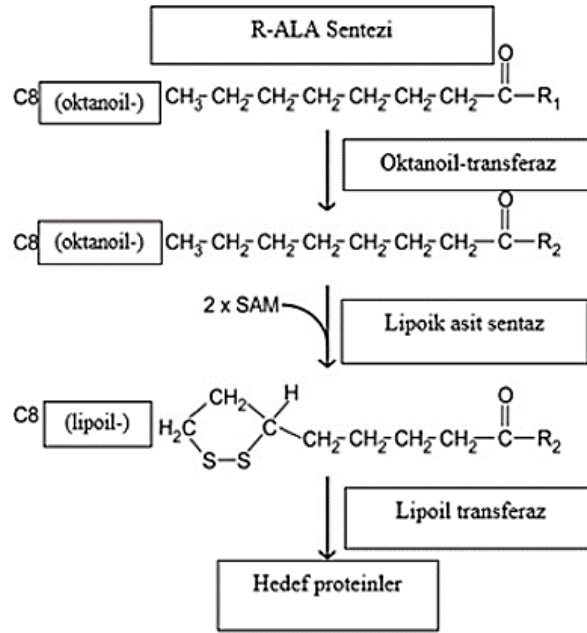


Şekil 2.7. DHLA'nın kimyasal yapısı.

DHLA: Dihidrolipoik asit

2.5.1. Alfa Lipoik Asit Sentezi

Alfa lipoik asit, mitokondride 8 karbonlu doymuş bir yağ asidi olan oktanoik asitten (kaprilik asit) ve sisteinden sentezlenir. Yapısındaki kükürt atomunun kaynağı sisteindir ve ditiyol bileşiği özelliğini alır (112). Ayrıca bitkisel ve hayvansal gıdalardan da diyet yoluyla alınabilir. Endojen olarak R-ALA formu sentezlenir. Oktanoik asit, yağ asidi sentez yolundan, oktanoil-transferaz enzim ile açıl taşıyıcı proteinin tiyoesteri olarak lipoil alan proteinin amidine transfer edilir. Daha sonra lipoik asit sentaz tarafından yapısında bulunan 2 hidrojen S-Adenozil Metiyonin (SAM) ile sülfür gruplarıyla değiştirilir. R-ALA, kofaktör olarak bir enzimin lipoil alanındaki terminal lizil kalıntısına lipoil transferaz ile kovalent olarak bağlanır (113).



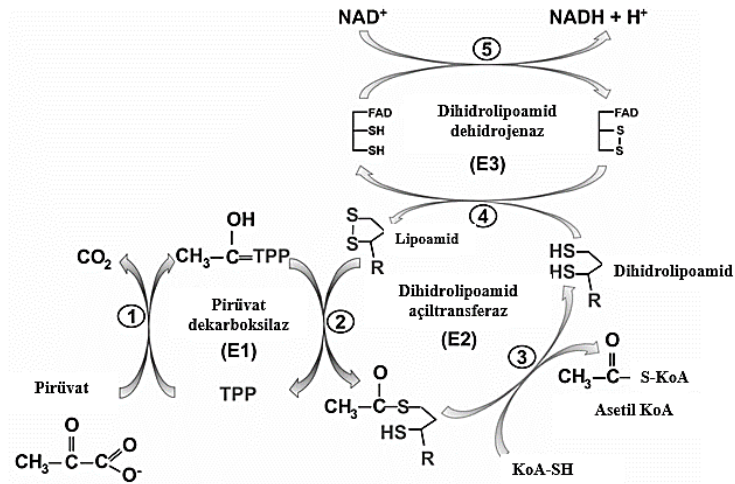
Şekil 2.8. R-Alfa lipoik asit sentezi

113 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. SAM: S-Adenozil Metiyonin

2.5.2. Metabolik Aktivitesi

R-Alfa lipoik asit, mitokondriyal çoklu enzim komplekslerinin kofaktörüdür. Bu enzimlerin proteinlerindeki lizil kalıntılarına kovalent bağlanır ve prostetik grup

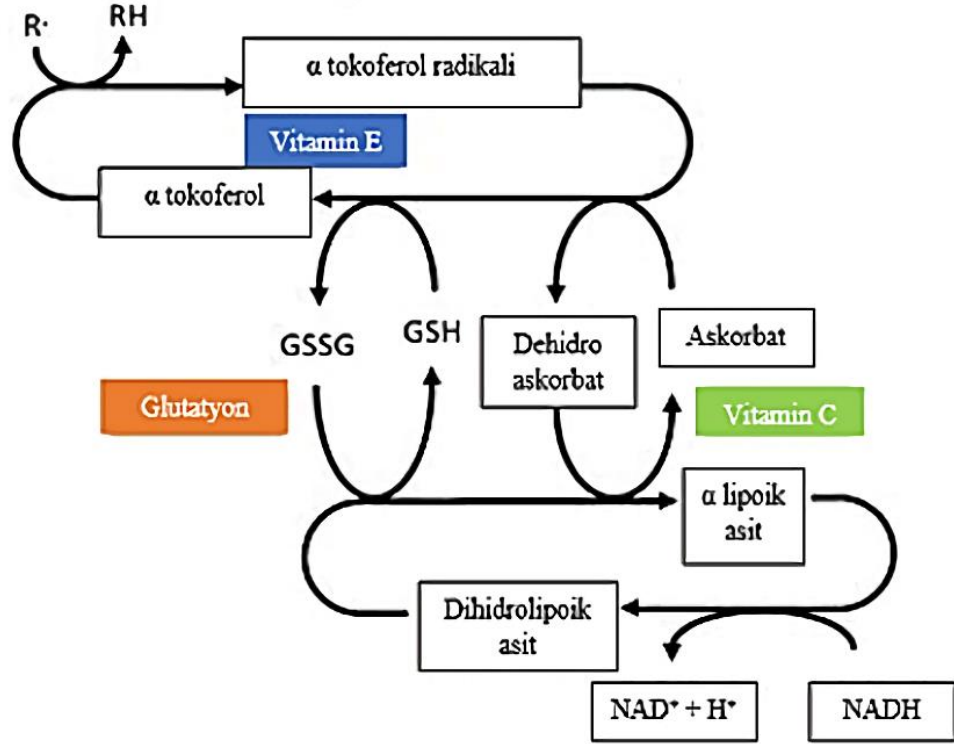
özelliğini alır. Bu enzimler, sitrik asit döngüsünde pirüvatın, asetil koenzim A (Asetil KoA)'ya dönüşümünü katalize eden pirüvat dehidrojenaz enzim kompleksi; sitrik asit döngüsünde α -ketoglutaratın süksinil KoA'ya dönüşümünü sağlayan α -ketoglutarat dehidrojenaz enzim kompleksi; valin, lösin, izolösin gibi dallı zincirli aminoasit katabolizmasında görevli dallı zincirli α -ketoasit dehidrojenaz enzim kompleksi ve lizin, hidroksilin, triptofanın katabolik yolunda rol alan 2-oksoadipat dehidrojenaz enzim kompleksidir (114). ALA, bu enzimlerde açıl taşıyıcı olarak rol oynamaktadır. Pirüvat dehidrojenaz enzim kompleksi 3 enzimden oluşmaktadır. Bunlar; pirüvat dekarboksilaz, dihidrolipoamid açıltransferaz ve dihidrolipoamid dehidrojenazdır. Öncelikle 3 karbonlu pirüvat, pirüvat dekarboksilaz enzimi ile CO_2 kaybeder ve açıl grubu enzimdeki tiamin pirofosfata (TPP) aktarılır. TPP, bu açıl grubunu 2. enzim olan dihidrolipoamid açıltransferazdaki lipoamid birimine aktarır. Açıl grubu Koenzim A (KoA) ile birleştirilerek asetil KoA sentezlenir. İkinci enzimdeki lipoamid, dihidrolipoamide indirgenir. Üçüncü enzim olan dihidrolipoamid dehidrojenaz, indirgenmiş lipoik asitteki elektron ve protonları önce Flavin Adenin Dinükleotid'e (FAD) aktararak FADH_2 oluşturur ve dihidrolipoamid, lipoamid haline dönüşür. Daha sonra FADH_2 'deki elektron ve protonlar Nikotinamid Adenin Dinükleotid'e (NAD) aktarılarak NADH sentezi gerçekleşir (Şekil 2.9) (115).



Şekil 2.9. Pirüvat dehidrojenaz enzim kompleksi

116 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. E: Enzim TPP: Tiamin pirofosfat, KoA: Koenzim A. 1: Pirüvatın dekarboksilasyonu sonucu oluşan açıl grubunun TPP'ye aktarımı 2: Açıl grubunun TPP'den lipoamid birimine aktarılması 3: Açıl grubunun KoA'ya aktarılarak Asetil KoA sentezlenmesi 4: Dihidrolipoamiddan lipoamid oluşumu, FAD'ın FADH_2 'ye indirgenmesi 5: FADH_2 'den $\text{NADH} + \text{H}$ oluşumu

Alfa lipoik asit ve dihidrolipoik asitin her ikisi de antioksidan aktiviteye sahiptir (117). Bu etkisini nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf-2) aktivitesini arttırarak gerçekleştirir. Nrf-2, inaktif olarak sitozolde bulunur. Oksidatif stres durumunda aktif hale gelerek nükleusa transloke olur ve antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını artırır (118). En önemli biyolojik aktiviteleri; reaktif oksijen türlerini (ROS) uzaklaştırma, indirgenmiş glutatyon, C vitamini ve E vitamini gibi antioksidanların rejenerasyonu, oksitlenmiş proteinlerin onarımı, metal iyonlarının şelasyonu, NF- κ B inhibisyonu ve insülin duyarlaştırıcı etkisidir (119, 120).



Şekil 2.10. ALA'nın antioksidan etkisi

121 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. R : Serbest radikal RH: R redükte formu GSSG: Okside glutatyon GSH: Redükte glutatyon

Glutatyon, C vitamini (askorbik asit) ve E vitamini (α tokoferol) antioksidan etkilerini redükte formlarıyla gerçekleştirirler. Serbest radikal hasarından hücre membranını koruyan temel antioksidan E vitaminidir. Serbest radikali indirger ve E vitamini radikal formuna dönüşür. Bu radikal form, redükte glutatyon ve askorbik asit

ile indirgenerek tekrar antioksidan özellik kazanır. Redükte glutatyon okside glutatyona, askorbik asit ise dehidroaskorbik asite dönüşür. Bu döngüde ALA ve DHLA, okside glutatyon ve dehidroaskorbik asitin tekrar redükte formlarına dönüşümüne aracılık eder (122) (Şekil 2.10). Fizyolojik koşullarda demir, bakır, çinko gibi metal iyonları bazı proteinlerin kofaktörüdür. Bu metal iyonlarının eksikliği veya fazlalığı birçok hastalığa neden olmaktadır. ALA ve DHLA, bu metal iyonlarının şelasyonunu sağlayarak stabil hale getirirler (123). NF-κB, inflamatuvar süreçte birçok genin ekspresyonunu indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Aynı zamanda inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırır (124). ALA, NF-κB'yi inhibe ederek anti-inflamatuvar özellik gösterir (125). Özellikle IL-1β seviyelerini azaltarak düşük riskli gebeliklerin tedavisinde olumlu etkisi olduğu bulunmuştur (126). İnsulin duyarlaştırıcı özelliği olan ALA bu etkisini, IRS proteinini fosforilleyerek gerçekleştirir. PI3K/Akt yolunu aktive ederek hücre içine glukoz transportunu sağlar (Şekil 2.11) (127).

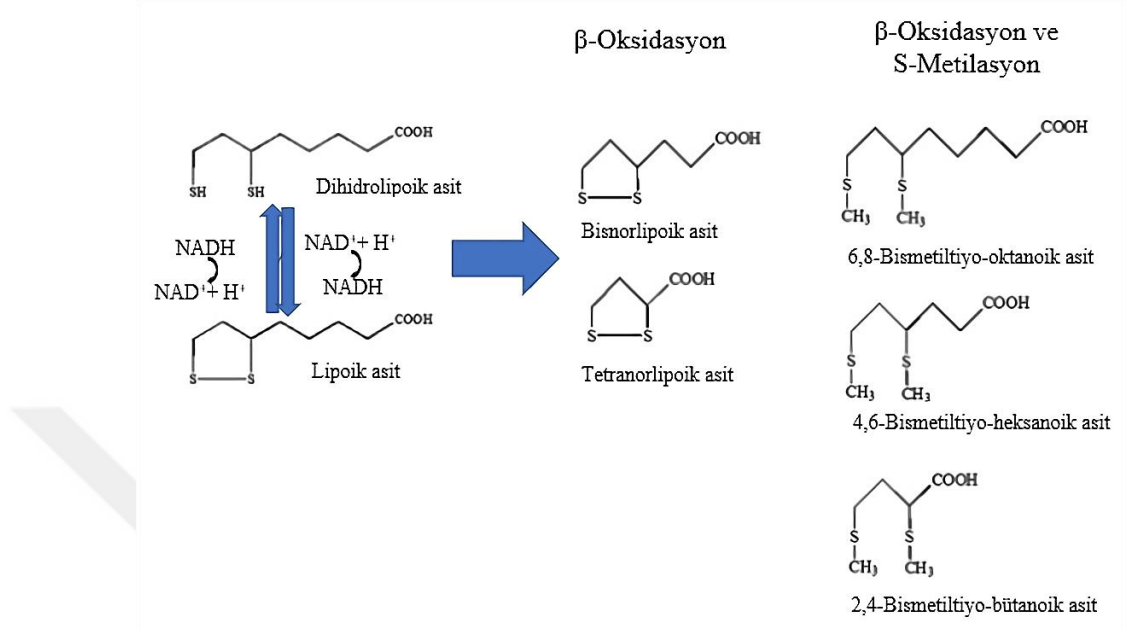


Şekil 2.11. ALA'nın çoklu etkisi

2.5.3. Emilimi ve Eliminasyonu

Alfa lipoik asit, hem suda hem yağda çözünebildiği için hücre içi ve dışında antioksidan özellik gösterir. Sebze ve et gibi diyet kaynaklarından da alınır. Diyetle alınan formu R-ALA'dır ve proteinlere bağlı olarak bulunur. Diyetle alınan R-ALA, plazma düzeyinde tespit edilebilir bir artışa neden olmaz ve kofaktör olarak kullanılamaz. Özellikle diyetle alım antioksidan aktivite için önemlidir. Genel olarak antioksidan aktivitesi için günlük 20-50 mg dozunda alınması önerilir. Takviyelerdeki ALA, R-ALA ve S-ALA'nın rasemik bir karışımıdır ve proteine bağlı değildir. Takviye edici gıdalarda miktar 50-600 mg arasında değişir ve diyetle aldığımız miktarın yaklaşık 1000 katıdır. Aç karnına alınması Emilimi artırır. R-ALA, S-

ALA'ya göre plazmada ki pik yaptığı konsantrasyonu daha fazladır. ALA, hücre içinde DHLA'ya indirgenir (128, 129). ALA, karaciğerde metabolize edilir ve renal yol ile atılır (110) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. ALA ve DHLA'nın metabolitleri.

110 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. ALA ve DHLA β-oksidadasyon ve S-metilasyon ile 5 farklı metabolite ayrılır ve idrar yolu ile atılır.

2.2.8. Oksidatif Stres İlişkisi

Serbest radikal üretimi ve antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulup, serbest radikallerin artışı oksidatif strese neden olmaktadır. Serbest radikaller hücre içi ve dışında oluşarak çeşitli mikromoleküller ve makromoleküller ile etkileşime girerler. Bunun sonucunda DNA ve protein hasarı meydana gelmektedir. Normal reaktif oksijen türleri (ROS), oosit gelişimi ve folikül oluşumunda aktif rol oynarlar. Oksidatif stres durumunda bu süreçlerde bozukluk meydana gelmektedir. Hiperandrojenemi Nrf-2 inhibisyonuna sebep olmaktadır (130). Reaktif oksijen türlerinin artması, NLRP3 aktivasyonuna neden olmakta ve IL-1 β ve IL-18 seviyelerini yükseltmektedir (131). PKOS'lu kadınlarda oksidatif stres belirteçleri yüksekken, toplam serum antioksidan kapasite düşüktür. Böylelikle PKOS patofizyolojisinde oksidatif stresin de katkısı olduğu söylenebilir (132).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Biriminin TTU-2023-9158 proje numarasıyla desteklenen çalışmamız, SDÜ Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ile Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Projemiz, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan, 08.06.2023 tarih ve 179 karar sayısı ile onay alarak etik kurul kurallarına uygun şekilde yapılmıştır.

3.1. Gereç

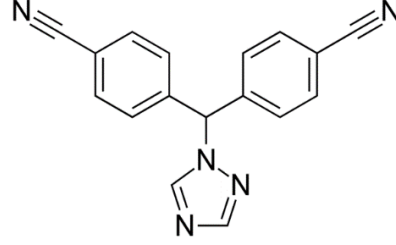
3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Wistar Albino türü 32 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce hayvanların gerekli sağlık kontrolleri yapıp, canlı ağırlıkları ölçülmüştür. Deney süresince sıçanlar sabah 06:00'da ışıkların açılmasıyla 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde ve $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarında tutulmuş, yeterli miktarda yem ve suya erişimleri sağlanmıştır. Genç erişkin 6-7 haftalık 150-250 gram olan sıçanlar rastgele 4 gruba ayrılmış olup Euro tip 4 kafeslerde tutulmuştur. Sıçanlar, Kontrol (K, n=8), Alfa Lipoik Asit (ALA, n=8), PKOS (PKOS, n=8), PKOS-Alfa Lipoik Asit (PKOS-ALA, n=8) olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır.

3.1.2. Letrozol

Letrozol, 19 karbonlu androjenlerin, 18 karbonlu östrojenlere dönüşümünü sağlayan aromataz enzimini selektif ve yarışmalı olarak inhibe eden 3. nesil aromataz inhibitörüdür. Steroid yapıda değildir. Aromataz enziminde hem kısmına bağlanarak etkisini gösterir. Androstenedionun yapısına benzer özellik gösterir. Siyanobenzil ve nitrojen kısımları içerir (Şekil 3.1) (133, 134). Oral yol ile alındığında biyoyararlanımı yüksektir. Yiyecekler ile alımı biyoyararlanımını etkilemez. Plazma proteinlerine zayıf olarak bağlanır ve yarılanma ömrü yaklaşık 48 saattir (135, 136). Eliminasyonu karaciğerde oksidatif metabolizma ve glukuronidasyon ile olur ve daha sonra renal yol ile atılır (137). Hormon reseptör pozitif meme kanserinin tedavisinde altın standarttır (138). Androstenedionun E1'e, testosteronun E2'ye dönüşümünü engelleyerek

androjen seviyelerini yükseltir. Sıçanlarda 21 günlük oral yol ile uygulama PKOS fenotipinin gelişmesine neden olmaktadır (139).



Şekil 3.1. Letrozolün kimyasal yapısı

3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Nüve NF 1200 R model soğutmalı (Türkiye)
3. Derin dondurucu: Kirsch Bosch -80°C (Almanya)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipet: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
8. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
9. Biyokimya analizörü: Beckman Coulter AU5800 (Japonya)
10. Cam-Teflon homojenizatör
11. ELİSA plate yıkayıcı: Bio-tek marka ELx 50 model otomatik strip yıkayıcı (ABD)
12. ELİSA okuyucu: Rayto RT-6000 Microplate Reader (Çin)
13. İdrar Santrifüj Tüpü 15 ml (Isolab Almanya)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1- Letrozol (Novartis Pharma Schweiz AG, İsviçre)
- 2- Fosfat buffer salin tablet (P4417, Sigma)
- 3- Alfa-lipoik asit (Thioctacid T flacon, MEDA Pharma, Hamburg, Almanya)
- 4- Karboksi metil selüloz (Sigma-Aldrich, USA, C5678)
- 5- Ketasol % 10 (Ketamin hidroklorür 100 mg) (Richter Pharma, Avusturya)
- 6- Rompun %2 enjeksiyonluk Çözelti 25 ml (Bayer, Almanya)

3.1.5. Kullanılan Reaktif Malzemeleri

- 1- BT-Lab Rat IL-1 β ELİSA kiti katalog no: E0119Ra (Çin)
- 2- BT-Lab Rat IL-18 ELİSA kiti katalog no: E0117Ra (Çin)
- 3- Rel Assay Diagnostics Total Antioksidan Status (Türkiye)
- 4- Rel Assay Diagnostics Total Oksidan Status (Türkiye)

3.1.6. Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu; pH: 7,4 fosfat buffer salin tabletten (P4417, Sigma) bir tablet alınıp 200 ml suya karıştırılarak yapılmıştır. Toplamda bir litre fosfat tamponu hazırlanmıştır. %1 Karboksi metil selüloz çözeltisi; Karboksi metil selülozdan (Sigma-Aldrich, USA, C5678) 1 gr tartılarak 100 ml suda çözünmesiyle elde edilmiştir. Toplamda 500 ml olarak hazırlanmıştır.

3.1.7. Serum ve Over IL-1 β Düzeylerin Çalışma Prensibi

Sıçan serum ve over dokusundan IL-1 β düzeyinin kantitatif ölçümü çift antikor sandviç enzim-bağlı immünsorbent ölçüm [enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)] yöntemiyle ticari kit (BT-Lab, Şangay, Çin) ile çalışılmıştır.

Kit 5 nokta kalibratör içermektedir (2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml). Standartlar çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite

verileri alınmıştır. Çalışma bitiminde standartların optik dansite/konsantrasyon grafiği elde edilmiş ve numunelerin konsantrasyonu bu grafikten faydalanılarak ng/ml cinsinden hesaplanmıştır. Sensitivitesi 0,08 ng/ml'dir.

3.1.8. Serum ve Over IL-18 Düzeylerin Çalışma Prensi

Sıçan serum ve over dokusundan IL-18 düzeyinin kantitatif ölçümü çift antikor sandviç enzim-bağlı immünsorbent ölçüm [enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)] yöntemiyle ticari kit (BT-Lab, Şangay, Çin) ile çalışılmıştır.

Kit 5 nokta kalibratör içermektedir (25 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 200 pg/ml, 400 pg/ml). Standartlar çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite verileri alınmıştır. Çalışma bitiminde standartların optik dansite/konsantrasyon grafiği elde edilmiş ve numunelerin konsantrasyonu bu grafikten faydalanılarak ng/ml cinsinden hesaplanmıştır. Sensitivitesi 1,02 pg/ml'dir.

3.1.9 Serum Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Çalışma Prensi

Örneklerde spektrofotometrik yöntem ile Rel Assay Diagnostics kitleri kullanılarak total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) çalışılmıştır. Her iki kitin de Beckman Coulter AU5800 otoanalizörüne aplikasyonu yapılmıştır.

TAS prensibi:

Örnek içindeki antioksidan maddeler, kit içindeki reaktiflerden olan koyu mavi-yeşil renkteki ABST radikal solusyonunu renksiz forma indirgemıştır ve reaksiyon karışımının 660 nm'deki absorbans değişimi ölçülmüştür. Absorbans değişimi, numunedeki TAS miktarı ile korelidir. Yöntemin kalibrasyonu stabil antioksidan standart solüsyonu (E vitamini analogu) Trolox Equivalent ile yapılmıştır.

TOS prensibi:

Örnek içindeki oksidan maddeler, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon haline okside etmiştir. Ferrik iyon formu, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirmiştir. Renk oluşumu; numunedeki oksidan moleküllerin miktarı ile orantılı olduğundan, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve TOS değeri elde

edilmiştir. Yöntemin kalibrasyonu hidrojen peroksit ile yapılmıştır. Elde edilen TAS ve TOS sonuçlarından OSI değerleri hesaplanır. TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./lt) değerinin TAS (mmol Trolox equiv./lt) değerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır.

3.1.10. Genetik Analiz için Kullanılan Sarf ve Ekipmanlar

- 1- Roche, TriPure Isolation Reagent Cat. No. 11 667 165 001 200 ml
(Almanya)
- 2- Merck, Isopropanol Cat. No. 109634 (Almanya)
- 3- Merck, EtOH Cat. No. 100983 (Almanya)
- 4- Invitrogen™ UltraPure™ Dnase/Rnase-Free Distilled Water Catalog No. 10-977-023 (Türkiye)
- 5- Thermo RevertAid RT Reverse Transcription Kit Cat. No. K1691 (Türkiye)
- 6- Roche, LightCycler® 480 SYBR Green I Master Cat. No. 4707516001
(Almanya)
- 7- Roche, ® 480 Multiwell Plate 96, White Product No. 04729692001
(Almanya)
- 8- SOLAB, Filtreli pipet uçları (10,100,1000 μl) *Cat. No. TF-R-S-010 pipet ucu – filtreli – ISOLAB – şeffaf – 10 μl – kutu – steril 96 adet/kutu *Cat. No. TF-R-S-100 pipet ucu – filtreli – ISOLAB – şeffaf – 100 μl - kutu –35 steril 96 adet/kutu *Cat. No. TF-R-S-1000 pipet ucu – filtreli – ISOLAB – şeffaf – 1000 μl – kutu – steril 96 adet/kutu (Almanya)
- 9- Thermo, 0,2 mL PCR tüpü Catalog number: AB0620 Tubes, 0.2 mL, flat cap (Türkiye)
- 10-ISOLAB, 1,5 mL steril mikrosantrifüj tüpü Cat. No. 078.03.022 (Almanya)
- 11- Primers From Macroge (İspanya)

3.1.11. Genetik Analiz için Kullanılan Cihazlar

- 1- -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific – U535) (ABD)
- 2- -20°C derin dondurucu (Türkiye)
- 3- Nanodorop 2000 (Thermo Scientific) (Türkiye)
- 4- Allegra X-15R Refrigerated Centrifuge (Beckman Coulter) (ABD)
- 5- Thermal Block (Biosan TS100-C) (Letonya)
- 6- Vorteks cihazı (Biosan V-1 Plus) (Letonya)
- 7- Santrifüj (Hettich Universal 320R) (Almanya)
- 8- Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied) (İsviçre)
- 9- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) (Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Prosedürü

Polikistik over sendrom modeli daha önce yapılan çalışmalardan yararlanılarak oluşturulmuştur. PKOS oluşturacağımız gruplara (PKOS ve PKOS-ALA grupları), deneyin başladığı gün letrozol 1 mg/kg dozunda %1'lik karboksi metil selüloz çözeltisinde (KMS), 2 ml/kg hacminde 21 gün boyunca oral gavaj yolu ile uygulanmıştır (140). K ve ALA gruplarına eş zamanlı olarak %1 KMS çözeltisi 2 ml/kg hacminde oral gavaj ile verilmiştir. Ardından 4 hafta boyunca ALA ve PKOS-ALA gruplarına alfa lipoik asit 100 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. K ve PKOS gruplarına eş zamanlı olarak 4 hafta serum fizyolojik (SF) i.p. uygulanmıştır (Şekil 3.2). Belirtilen ilaçlar veteriner hekim gözetiminde her sabah saat 9:00'da uygulanmıştır. Deneyin başladığı ilk günden itibaren her haftanın sonunda sıçanların kiloları tartılarak ilaç dozu ayarlaması yapılmıştır.

Gruplar	1.gün	21.gün	49.gün
K	%1 KMS		SF
ALA	%1 KMS		100 mg/kg ALA
PKOS	Letrozol		SF
PKOS-ALA	Letrozol		100 mg/kg ALA

Şekil 3.2. Deney prosedürü



Resim 3.1. Letrozolün oral gavaj uygulaması



Resim 3.2. ALA'nın intraperitoneal uygulaması

3.2.1.1. Vajinal Smear Alınması

Sıçanlarda östrus döngüsü ortalama 4-5 gündür ve 4 fazdan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus fazlarıdır (141).

Proöstrus fazı:

Sıçanlarda proöstrus fazı ortalama 14 saattir. Mikroskopide baskın hücre tipi çekirdekli epitelyal hücrelerdir. Küçük ve yuvarlak özellikleri olan bu hücreler küme olarak veya tek tek görülebilir. Bu fazın özellikle erken döneminde nötrofiller az sayıdadır. Büyük epitelyal hücreler ve keratinize çekirdeksiz hücreler bu fazda az sayıda görülmektedir (142).

Östrus fazı:

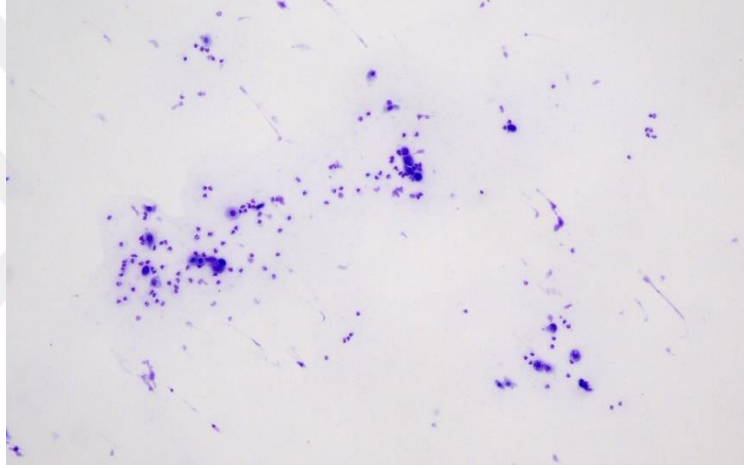
Sıçanlarda östrus fazı ortalama 24-48 saattir. Bu fazda mikroskopik olarak baskın hücre tipi çekirdeksiz keratinize epitelyal hücrelerdir. Çekirdekli epitelyal hücreler bu fazda az sayıda görülmektedir. Nötrofiller özellikle bu fazın ilk yarısında az sayıda görülmekle birlikte genellikle ikinci yarısında görülmez (143).

Metöstrus fazı:

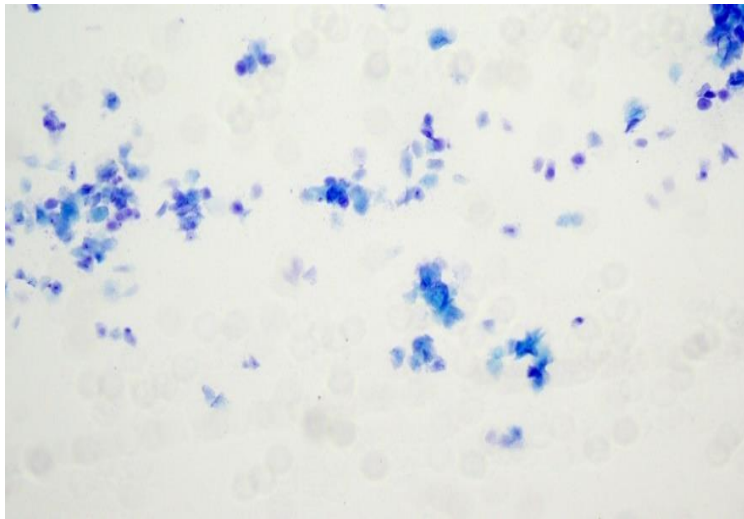
Sıçanlarda metöstrus fazı ortalama 6 ile 8 saat sürmektedir. Bu fazda mikroskopik olarak baskın hücreler nötrofiller ve çekirdeksiz keratinize epitelyal hücrelerdir. Çekirdekli epitelyal hücreler az sayıda görülmektedir (144).

Diöstrus fazı:

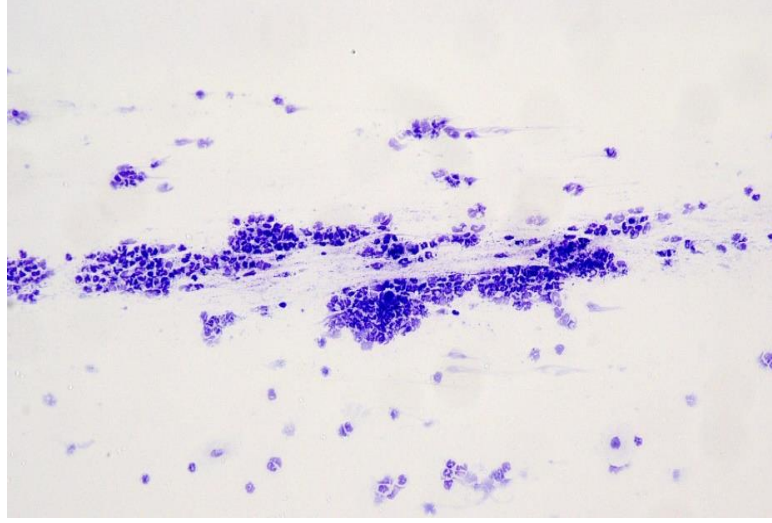
Sıçanlarda ortalama 48-72 saat ile en uzun faz diöstrus fazıdır. Mikroskopide baskın hücre tipi nötrofiller olmakla birlikte bazen yalnızca nötrofiller gözlenmektedir. Erken diöstrus döneminde nötrofiller küme yapmış şekilde gözlenebilir. Çekirdekli epitelyal hücreler de genellikle yoğun olarak görülebilmekle beraber çekirdeksiz keratinize epitelyal hücreler az sayıda veya yoktur (142).



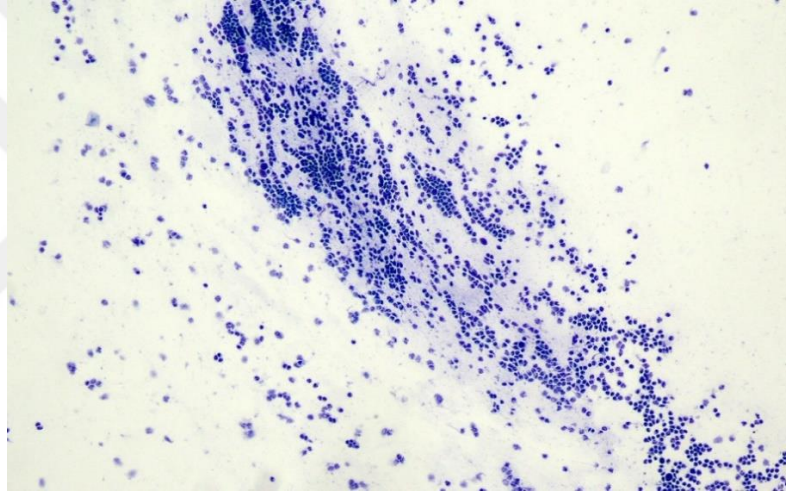
Resim 3.3. Proöstrus fazı (Giemsa x100)



Resim 3.4. Östrus fazı (Giemsa x100)



Resim 3.5. Metöstrus fazı (Giemsa x100)



Resim 3.6. Diöstrus fazı (Giemsa x100)

Polikistik over sendromu oluşumunu doğrulamak için deneyin başladığı günden itibaren 21 gün boyunca vajinal smear günlük olarak alınmıştır (140). Smear örnekleri her bir sıçandan sabah saatlerinde günlük olarak alınmıştır. 1 ml steril pastör pipeti içerisine 0,2 ml SF çekilmiş ve sıçan dorsalinden, avuç içinde tutularak pipetle vajinadan 5-10 mm derinlikte giriş yapılmış çok ilerlemeden SF sıvısı verilmiş ve pipete tekrar geri çekilmiştir. Bu işlem 2-3 kez tekrarlanmıştır. Pipetin içine alınmış olan salgı örneği bir lam üzerine ince bir tabaka halinde yayılarak bir tabla üzerinde oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan lamlar 5 dakika boyunca Giemsa boyasında bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp entellan ile lamelle kapatılmıştır. Işık mikroskopisinde değerlendirilmiştir. Günlük olarak bakılan smear preparatları

sonucunda K ve ALA gruplarındaki sıçanların östrus döngüsü proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus fazlarından oluşmakta ve bu fazlar düzenli olarak birbirini takip etmekteydi. PKOS ve PKOS-ALA gruplarındaki sıçanlar ilk 1 hafta düzenli östrus döngüsü sergilese de letrozol uygulamasının son 14 günü uzamış diöstrus fazında kalmışlardır. Dolayısıyla bu gruplarda PKOS geliştiği yapılan günlük smear bakışı ve uzamış diöstrus fazı ile doğrulanmıştır.

3.2.2. Over Dokusunun Elde Edilmesi

Sıçanlara 49 gün boyunca ilaç uygulamasının ardından 50. Gün i.p. olarak %10 ketamin HCl (90 mg/kg) ve ksilazin HCl (10 mg/kg) ile anestezi uygulanmıştır. Abdominal insizyon ile vena cava inferiordan cerrahi eksanguinasyon yapmak amacı ile kanları alınmıştır (Resim 3.7). Alınan kanlar jelli, serum ayrıştırıcı biyokimya tüplerine alınmıştır. Spontan pıhtılaşma için 20 dakika oda ısısında dik bir pozisyonda bekletilmek üzere ayrılmıştır. Ardından bilateral salpingoofektomi uygulanmıştır. Soğuk fosfat tamponu ile ıslatılan buz aküleri üzerinde over dokuları tuba uterinadan ayrılmıştır (Resim 3.9). Her 2 over hassas terazide tartılarak ağırlıkları hesaplanmıştır. Sıçanların sağ overleri soğuk fosfat tamponu ile dolu ependorf tüplerine alınarak biyokimyasal analiz için ayrılmıştır. Sol overlerin yarısı formol dolu kaplara alınarak histopatolojik inceleme için ayrılmıştır. Sol overin diğer yarısı genetik analiz için boş ve kuru ependorf tüplerine alınarak ayrılmıştır. Biyokimyasal analiz için her sıçandan alınan over dokuları fosfat tamponu ile 10 kat dilue edilmiştir. Janke & Kunkel Ultraturax T-25 (Almanya) marka doku parçalayıcı ile ortalama 1 dakika işlemin ardından UW-2070 Bandeun Electronic (Almanya) marka sonikatör ile 30 saniye sonike edilerek homojenizasyon işlemi tamamlanmıştır. Homojenize edilen dokular Eppendorf 5415-R (Almanya) markalı soğutmalı santrifüj ile 10000 devir/dk'da 10 dakika boyunca santrifüj edilerek supernatant kısmı ependorfa aktarılmıştır. Bu ayrılan supernatanttan Beckman Coulter Urinary/CSF Protein kiti ile Beckman Coulter AU5800 biyokimya otoanalizöründe protein tayini yapılmıştır. Bu ölçüm, pirogallol kırmızı-molibdat kompleksinin proteinin amino gruplarına bağlanıp absorpsiyonda meydana gelen değişime dayanmaktadır. Absorbansta maksimum 600 nm olan mavi-mor bir kompleks oluşmaktadır.



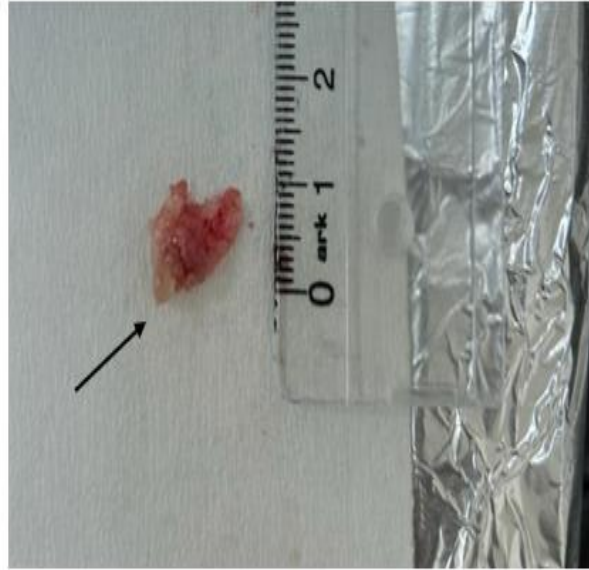
Resim 3.7. Sıçan kan alımı



Resim 3.8. Tuba uterina ve over dokusu



Resim 3.9. Tuba uterinadan ayrılmış bilateral over dokuları



Resim 3.10. Polikistik over görüntüsü

3.2.3. Serum Numunelerinin Elde Edilmesi

Spontan pıhtılaşan biyokimya tüpünde ki kanlar 3000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüj edilmiş, serum kısmı ependorflara 3 porsiyon olacak şekilde ayrılmıştır. Serum ve over dokusundan rat spesifik ELISA kitleriyle IL-1 β (BT-Lab) ve IL-18 (BT-Lab) çalışılmıştır. Over dokusundan çalışılan IL-1 β , IL-18 sonuçları doku protein miktarı ile karşılaştırılarak gram protein başına miktar olarak hesaplanmıştır. Serumdan Beckman Coulter AU5800 cihazına applike edilen kitler (Rel Assay) ile TAS ve TOS çalışılarak OSI değeri hesaplanmıştır.

3.2.4. Histopatolojik Preparat Hazırlıkları

3.2.4.1. Doku Örneklerinde Histopatolojik Çalışma

3.2.4.1.1. Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması

Doku örnekleri deney hayvanlarından çıkarıldıktan sonra direk olarak %10 nötral formalin içerisinde alınmış ve sonrasında 8 saat doku tespitine bırakılmıştır.

a) Doku takibi

Doku takip işlemi kapalı sistem tam otomatize doku takip cihazı (SLEE MTM I,Nürnberg/Almanya) ile yapılmış olup takip aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

Formalin %10 ; 2 saat (35 °C)

Alkolik formalin ; 1,5 saat

Alkolik formalin ; 1 saat

Alkol %95 ; 1 saat

Alkol %95 ; 45 dakika

Absolü alkol ; 45 dakika

Absolü alkol ; 1 saat

Ksilen ; 1 saat

Ksilen ; 1 saat

Parafin ; 1 saat 30 dakika

Parafin ; 1 saat

Parafin ; 1 saat

Toplam 13 saat 30 dakika

b) Dokuların parafine gömülmesi ve bloklama

Takip sonrası örnekler 60-65 °C' de erimiş parafine alınarak bloklama yapılmıştır.

c) Kesit alma

Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (SLEE CUT 5062, Nürnberg / Almanya) cihazı ile 3-4 µm kalınlığındaki kesitler lam üzerine alınmıştır.

d) Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması

Histopatolojik değerlendirme için elde edilen preparatlar 60°C etüvde 45 dakika bekletildi. Sonrasında tam otomatize boyama cihazında (SLEE CROMATEC, Nürnberg/Almanya) Hematoksilen&Eozin (H-E) ile boyandı. Boyama aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

Ksilen 5 dakika

Absolü alkol 5 dakika

%95 alkol 5 dakika

%75 alkol 5 dakika

Suda yıkama 5 dakika

Hematoksilen 6 dakika

Suda yıkama 1 dakika

Eozin 2 dakika

Suda yıkama 1 dakika

%75 alkol 1 dakika

%95 alkol 1 dakika

Absolü alkol 1 dakika

Ksilen 2 dakika

Preperatlar entellan ile kapatılmıştır.

3.2.4.2. Örneklerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Over dokularına ait örnekler binoküler ışık mikroskobu (ECLIPSE Cİ-L, Nikon, Tokyo, Japonya) ile değerlendirilmiştir.

3.2.5. Over Dokusu IL-1 β ve IL-18 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Tayini

3.2.5.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.2.5.1.1. RNA İzolasyonu

Elde edilen dokular DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen önceden etiketli ependorf tüplerine konularak prosedür uygulanıncaya kadar -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Çalışma gününde oda ısısına getirilen doku örnekleri üzerine 1000 μ L Geneall RiboEXT^M solüsyonu (Seul/Kore) konularak sonikatörde düşük hızda homojenize edildi. RNA izolasyonu GeneAll Ribospin RNA izolasyon kiti (Seul/Kore) ile aşağıdaki protokole uygun olarak yapıldı.

1. Homojenize edilen örnekler oda ısısında 2 dk inkübe edildi ve üzerlerine 200 μ L kloroform ilave edilerek 15 sn vortekslendi.

2. Süpernatanın üzerine %70 lik etanolden 1-1 hacimde olacak şekilde eklendi ve santrifüj edilmeden pipetajla karıştırıldı.

3. Karışım 12.000 g'de 15 dk santrifüj edilir. Bu adım sonunda üç faz oluştu:

Alt faz (Renkli)

Orta faz (İnce Beyaz Opak)

Üst faz (Renksiz Şeffaf)

4. En üst şeffaf faz (yaklaşık 450 μ l) pipetle dikkatlice alınıp EzPure Filtresine (Sarı Renkli) aktarıldı. 10.000 g'de 30 sn santrifüjlendi.

5. Spin kolondan geçen sıvı boşaltıldı ve geri kalan Lizat+RBI karışımı da Mavi Renk Type W spin kolona tekrar aktarıldı.
6. 10.000 g'de 30 sn santrifüjlenip Spin kolondan geçen sıvı uzaklaştırıldı.
7. Spin Kolon üzerine 500 µl RBW ilave edilip, 10.000 g 'de 30sn santrifüjlendi ve alta geçen sıvı atıldı.
8. Spin kolon üzerine 500 µl RBN ilave edilip, 10.000 g 'de 30 sn santrifüj sonrasında alta geçen sıvı atıldı.
9. Spin kolonda kalabilecek alkolün tamamının uzaklaşması için 11.000 g de 3 dk santrifüj edildi.
10. Spin kolon yeni 1,5mL lik DNaz/RNase ve pirojen içermeyen ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 30 µl RNAase-free su ilave edildi.
11. 2 dk oda sıcaklığında bekletilip 10.000 g'de 30 sn santrifüj edilerek RNA örnekleri elde edildi.

Elde edilen RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere nanodrop cihazı ile miktar ve saflık tayini yapılmıştır. 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerin birbirine oranı (260 nm / 280 nm) RNA saflığını göstermektedir. Saflığı 1,8-2,0 arasında olan RNA numunelerinin miktar tayinleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere not edilmiş, saflığı bu oranlar dışında olan örneklerin RNA'ları tekrar izole edilmiştir. İzole edilen her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 1000 ng/µl'de standardize edilmiş ve cDNA sentez aşamasında kullanılmak üzere -80° C'ye kaldırılmıştır.

3.2.5.1.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, A.B.T.™ cDNA Sentez Kit (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye) protokolüne göre termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Her örnek için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik PCR tüplerine buz üzerinde aşağıdaki konsantrasyonlarda karışım hazırlanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim
10X reaksiyon tamponu	2 µl
dNTP karışımı (2.5 mM)	1 µl
Random hekzamer (50 µM)	2 µl
Revers Transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz inhibitör	0.5 µl
RNaz içermeyen su	3.5 µl
RNA örneği	10 µl

Hazırlanan karışım termal döngü cihazına (Thermo scientific/USA) yerleştirilmiş ve aşağıdaki kit protokolü kullanılmıştır (Tablo 3.2). Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2. Revers transkriptaz termal döngü protokolü

RT basamakları	Sıcaklık °C	Süre	Siklus
1. Basamak	25	10 dk	1
2. Basamak	37	120 dk	1
3. Basamak	85	5 dk	1
4. Basamak	4	∞	1

3.2.5.1.3. Primer tasarımı ve hazırlanması

Primer tasarımları, NCBI internet sitesi kullanılarak spesifik mRNA dizilimlerinin saptanması ve olası primer dizilimlerinin denenmesi ile yapılmıştır. Ekspresyon aşamasında kullanılan genler ve spesifik primer dizilimleri Tablo 3.3' de verilmiştir.

Dizaynı yapılan primerler ticari olarak sentezlettirilmiş, liyofilize olarak temin edilmiştir ve DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen, ticari olarak satılan hazır steril su ile stok 100 µM olacak şekilde sulandırılmıştır. Daha sonra stok primer solüsyonu kantitatif gerçek zamanlı PCR prosedüründe, kit üreticisi firmanın talimatlarına göre son hacimde 500 nM olacak şekilde tekrar sulandırılmıştır.

Tablo 3.3. Genler ve genlere ait spesifik primer dizilimleri

Gen	Spesifik Primer Dizilimi Forward (F)-Revers (R)	Ürün uzunluğu	Erişim Nosu
IL 1 β	F: TTGAGTCTGCACAGTTCCCC R: GTCCTGGGGAAGGCATTAGG	161 bp	NM_031512.2
IL 18	F: TCACTTCAGTGTCTCTGTGAGC R: TTCCAAGTCTGAGAGGCTGTGC	95 bp	NM_019165.2
GAPDH (HouseKeeping)	F: AGGTTGTCTCCTGTGACTTC R: CTGTTGCTGTAGCCATATTC	130 bp	NM_017008.4

IL-1β; İnterlökin 1 beta, IL-18; Interleukin 18, GAPDH: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz

3.2.5.1.4. Ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi

Ekspresyon seviyeleri A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase (Atlas Biyoteknoloji/ Türkiye) kitleri kullanılarak Biorad CFX96 (California/USA) gerçek zamanlı PCR cihazında ölçülmüştür. cDNA sentezi yapılan örnekler çalışmadan 10 dakika önce +4°C'de ki blok üzerine alınarak bir süre bekletilmiştir. Çalışmada GAPDH geni housekeeping gen olarak kullanılmış ve normalizasyon için bu genin Ct değerleri kullanılmıştır. Cihazda 0.1 ml' lik per tüpleri kullanılmış reaksiyon son hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon karışımı üretici protokolüne göre aşağıdaki gibi

hazırlanmıştır (Tablo 3.4). Reaksiyonun cihaza yüklemeyen başlamasını engellemek için prosedür buz üzerinde sürdürülmüştür.

Tablo 3.4. PCR reaksiyon karışımı

	Hacim	Final konsantrasyon
A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX)	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
cDNA	2 µl	2 µl
DNaz/RNaz içermeyen su	6 µl	6 µl

Elde edilen reaksiyon karışımı kit üreticisinin protokolüne göre belirlenen termal döngü (Tablo 3.5) ile gerçek zamanlı qPCR cihazına yerleştirilmiş ve her bir örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PCR döngüsü

PCR basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç denaturasyonu	95	300 sn	1
Denaturasyon	95	15 sn	40
Primer bağlanması / Uzama	55	30 sn	40
Melt-Curve Analizi	65-95	2-5 sn/basamak	1

Elde edilen Ct değerleri ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesi için her bir örnek ve grup için ayrı ayrı not edilmiştir. Normalize edilen örneklerin verilerine $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü uygulanmış ve elde edilen ham veriler kullanılacak olan istatistik çalışmasına uygun hale getirilmiştir.

3.2.5.2. Analiz

Real Time PCR ile elde edilen veriler Absolute Quantification ve Advanced Relative Quantification yöntemleriyle analiz edilmiştir. Sonuçlarda Relative Quantification yapabilmek için Fold Change metodu kullanılmıştır. Target gen Ct değerleri ACTB ile normalize edilmiş ve daha sonra kontrol grupları ile oranlanarak Fold Change değerleri bulunmuştur.

- 2'den büyük değerler anlamlı Target Up Regülasyon
- 2'den küçük değerler anlamlı Target Down Regülasyon
- -2 ve 2 aralığındaki değerler ise anlamsız olarak tanımlanır.

3.3. İstatistiksel Analiz

Serum ve over dokusunda IL-1 β ve IL-18 düzeyleri, over dokusunda IL-1 β ve IL-18 ekspresyonları, ortalama over ağırlıkları, vücut ağırlıkları, serum TAS, TOS düzeylerini değerlendirmek için önce Levene homojenite testi yapılmış, homojen dağılan veriler tek yönlü varyans analizi ve ardından Post hoc LSD Testi ile değerlendirilmiştir. Homojen olmayan histopatolojik veriler Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. İstatistik programı olarak SPSS v.22 (IBM, ABD) yazılımı kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Serum ve Over İnflamatuar Sitokinlerin Sonuçları

Serum IL-18 düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=2,853$ $p=0,005$). Post-hoc testi sonucu anlamlılığın PKOS grubundan kaynaklandığı saptanmıştır. Serum IL-18, PKOS grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla PKOS ile K grubu arasında $p=0,006$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,03$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,012$). IL-1 β serum düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=3,64$, $p=0,025$). Post-hoc test ile farklılığın PKOS grubundan kaynaklandığı saptanmıştır. PKOS grubunda serum IL-1 β düzeyleri açısından tüm gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla PKOS ile K grubu arasında $p=0,043$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,03$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,024$) (Tablo4.1).

Over dokusunda IL-18 düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=4,304$ $p=0,01$). Yapılan Post-hoc test ile farklılığın PKOS grubundan kaynaklandığı saptanmıştır. IL-18 over dokusunda ki düzeyi açısından PKOS grubunda, diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (PKOS ile K grubu arasında $p=0,031$, PKOS ile ALA $p=0,004$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,02$). Over dokusunda IL-1 β düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($df=3$, $F=8,875$, $p<0,001$). Post-hoc testi ile bu farklılığın PKOS grubundan kaynaklandığı bulunmuştur. Over dokusunda IL-1 β düzeyi açısından PKOS grubunda, tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla PKOS ile K grubu arasında $p=0,001$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,009$ PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,001$). Over dokusunda, K ile ALA grubu arasında, K ile PKOS-ALA grubu arasında, ALA ile PKOS-ALA grubu arasında IL-18 ve IL-1 β düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p>0,05$, $p>0,05$, $p>0,05$). Serum IL-18 düzeyleri açısından K ile ALA grubu arasında, K ile PKOS-ALA grubu arasında, ALA ile PKOS-ALA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p>0,05$, $p>0,05$, $p>0,05$). (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Serum ve over dokusunda IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

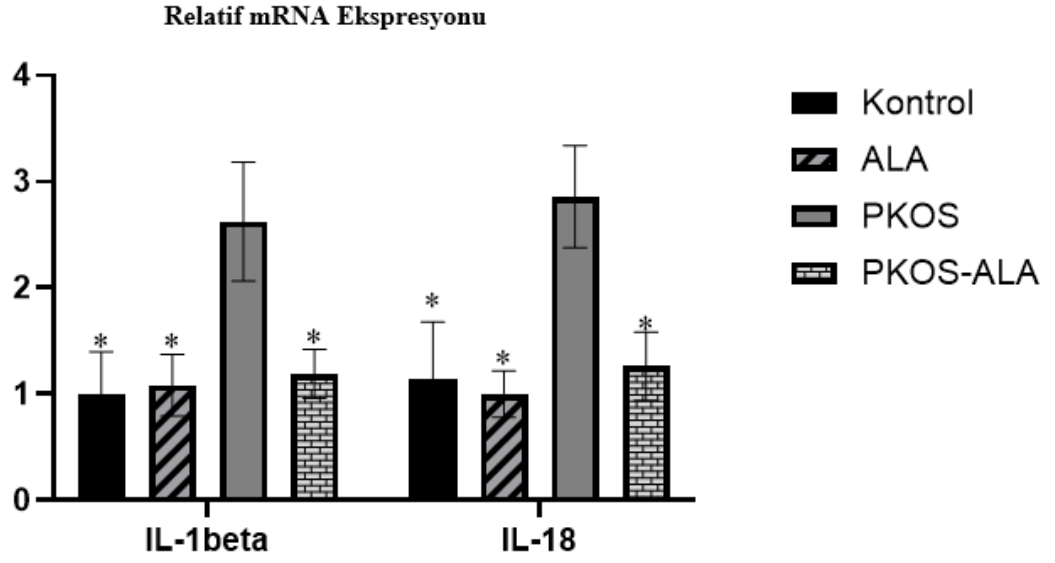
	Serum IL-1 β (ng/ml)	Over IL-1 β (ng/g protein)	Serum IL-18 (pg/ml)	Over IL-18 (pg/g protein)
K	8,16\pm5,29*	5,92\pm3,26*	62,45\pm11,32*	89,70\pm39,55*
ALA	7,56\pm4,14*	7,88\pm5,70*	61,86\pm11,91*	57,10\pm10,43*
PKOS	10,67 \pm 6,03	17,06 \pm 11,64	78,13 \pm 13,13	137,34 \pm 68,45
PKOS- ALA	5,80\pm2,47*	4,00\pm1,05*	60,38\pm10,56*	55,98\pm8,32*

**, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğunu ifade eder ($p < 0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi, post-hoc LSD testi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

4.2. Over Dokusunda IL-1 β ve IL-18 Ekspresyon Bulguları

Over dokusunda IL-18 ekspresyonu incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=34,085$, $p < 0,001$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için Post-hoc LSD testi yapılmıştır. Over dokusu IL-18 ekspresyon düzeyi PKOS grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur (PKOS ile K grubu arasında $p=0,008$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,002$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,02$) (Tablo 4.2). PKOS grubunda IL-18 gen ekspresyon düzeyinin K grubuna göre 2,5 kat arttığı görülmüştür (Grafik 4.1).

Over dokusunda IL-1 β ekspresyonu incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=15,947$, $p < 0,001$). Yapılan post-hoc testi sonucu IL-1 β ekspresyon düzeyi PKOS grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur (PKOS ile K grubu arasında $p=0,03$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,004$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,009$) (Tablo 4.2). PKOS grubunda IL-1 β gen ekspresyon düzeyinin K grubuna göre 2,64 kat arttığı saptanmıştır (Grafik 4.1). Over dokusu IL-1 β ve IL-18 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, K ile ALA grubu arasında, K ile PKOS-ALA grubu arasında, ALA ile PKOS-ALA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p > 0,05$, $p > 0,05$, $p > 0,05$).



Grafik 4.1. Over dokusunda IL-1 β ve IL-18 relatif mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

** PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi, post-hoc LSD testi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2. Over dokusunda IL-1 β ve IL-18 mRNA ekspresyon düzeyleri

	IL-1 β mRNA	IL-18 mRNA
K	0,99±0,41*	1,14±0,54*
ALA	1,08±0,29*	1,00±0,22*
PKOS	2,62±0,56	2,86±0,48
PKOS-ALA	1,19±0,23*	1,26±0,32*

** , PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi, post-hoc LSD testi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

4.3. Serum Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları

Serumdaki TAS, TOS ve OSI verilerinin tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesinde OSI’de istatistiksel anlamlılık saptanmıştır (df=3, F=2,513, p=0,04). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını tespit etmek için post-hoc LSD testi uygulanmıştır. Serum OSI değeri PKOS-ALA grubunda PKOS grubuna göre anlamlı düşük saptanmıştır (PKOS-ALA ile PKOS grubu arasında p=0,03). TAS düzeyi PKOS-ALA grubunda PKOS grubuna göre yüksek olsa da bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (PKOS-ALA ile PKOS grubu arasında p>0,05). Serum TOS düzeyi PKOS-ALA grubunda PKOS grubuna göre düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir (PKOS-ALA ile PKOS grubu arasında p>0,05).

Tablo 4.3. Serum oksidatif stres parametrelerinin sonuçları ve gruplar arası karşılaştırılması

	Serum TAS (mmol Trolox Eq/L)	Serum TOS (μ mol H ₂ O ₂ Eq/L)	OSI (Arbitrary Unit)
K	1,01±0,03	7,16±1,78	0,76±0,18
ALA	1,05±0,02	7,22±0,84	0,76±0,09
PKOS	0,94±0,04	7,72±1,71	0,81±0,20
PKOS-ALA	1,04±0,21	6,67±1,27	0,64±0,10*

**, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05). Veriler tek yönlü varyans analizi, post-hoc LSD testi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

4.4. Ortalama Over Ağırlıklarının Sonuçları

Sağ ve sol over ağırlıklarının ortalaması alınarak 100 gram vücut ağırlığına göre hesaplanmıştır. Ortalama over ağırlıkları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir (df=3, F=7,247, p<0,001). Anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunun

tespiti için post-hoc LSD testi yapılmıştır. K, ALA ve PKOS-ALA gruplarında ortalama over ağırlıkları PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (K ile PKOS grubu arasında $p=0,03$, ALA ile PKOS grubu arasında $p=0,02$, PKOS-ALA ile PKOS grubu arasında $p<0,001$). Ortalama over ağırlıkları düzeyi açısından, K ile ALA grubu arasında, K ile PKOS-ALA grubu arasında ALA ile PKOS-ALA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p>0,05$, $p>0,05$, $p>0,05$).

Tablo 4.4. Ortalama over ağırlıklarının düzeyleri ve gruplar arasında karşılaştırılması

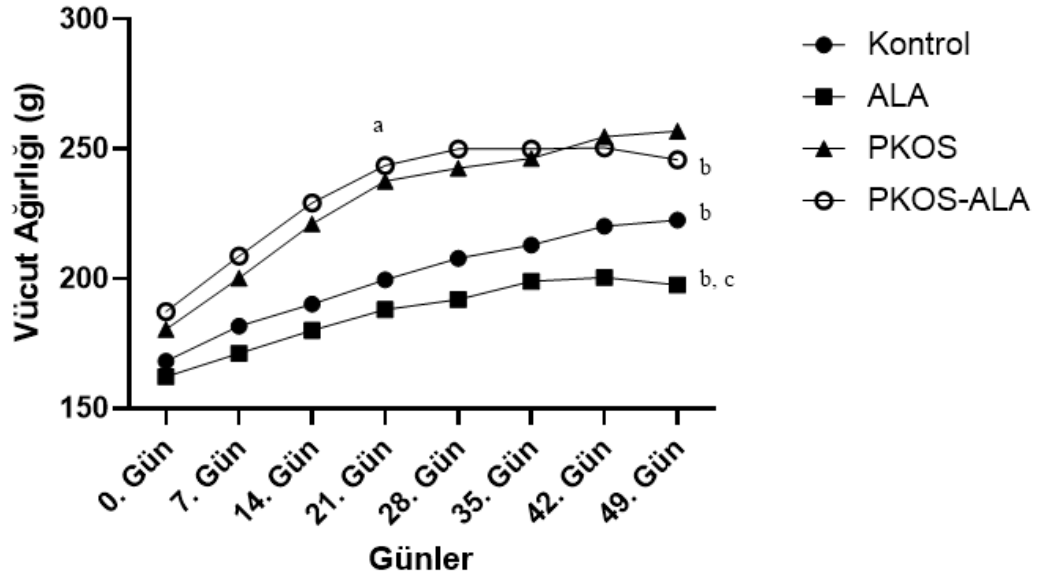
	Ortalama over ağırlığı (mg/100 g vücut ağırlığı)
K	22,1±0,6*
ALA	20,3±0,5*
PKOS	30,2±1,1
PKOS-ALA	22±1,2*

*, PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğunu ifade eder ($p<0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi, post-hoc LSD testi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

4.5. Sıçanların Haftalık Vücut Ağırlıklarının Düzeyleri

Deneyin başladığı gün 0. gün olarak kabul edilmiş olup her haftanın sonunda tüm sıçanların vücut ağırlıkları ölçülerek her grubun ortalama ve SD değerleri hesaplanmıştır. Deneyin ilk günü vücut ağırlıkları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Deneyin 21. Gününde PKOS ve PKOS-ALA grubundaki vücut ağırlıkları, K ve ALA gruplarına göre anlamlı artış göstermiştir (PKOS ile K grubu arasında $p=0,02$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,003$) (PKOS-ALA ile K grubu arasında $p=0,023$, PKOS-ALA ile ALA grubu arasında $p=0,02$). Deneyin 49. gününde PKOS grubunda ölçülen vücut ağırlıkları tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (PKOS ile K grubu arasında $p=0,011$, PKOS ile ALA grubu

arasında $p=0,033$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,04$). Deneyin 49. Gününde ALA grubunda ölçülen vücut ağırlıkları K grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0,001$) (Grafik 4.2).



Grafik 4. 2. Deneyin başlangıcında ve her haftanın sonunda ölçülen ortalama vücut ağırlıklarının değişimi

^a K ve ALA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

^b PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

^c K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

Tablo 4.5. Vücut ağırlıklarının ortalaması

	0. Gün	21. Gün	49. Gün
K	168,1±18,5	199,5±19,1	222,5±22,7^b
ALA	162,1±10,6	188±13,2	197,5±13,5^{b,c}
PKOS	180,3±11,8	237,5±13,8^a	269,7±21,1
PKOS-ALA	187,2±10,9	243,5±10,6^a	242,7±4,1^b

Ortalama vücut ağırlıkları gram cinsinden verilmiştir. Değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmektedir. ^a K ve ALA gruplarına göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05). ^b PKOS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05). ^c K grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).

4.6. Over Dokusunun Histopatolojik Bulguları

Kontrol gruplarından alınan over doku kesitlerinde, farklı gelişim aşamasında olan foliküllere rastlanmıştır. Foliküller, normal granüloza hücre tabakasıyla çevrili olarak gözlemlenmiştir. K ve ALA gruplarında nekrotik ve apoptotik hücrelere rastlanmamıştır (Resim 4.1) (Resim 4.2). PKOS grubunda ince bir granüloza hücre tabakasının çevrelediği kistik foliküller ve apoptotik, nekrotik hücreler gözlemlenmiştir (Resim 4.3).

Tablo 4.6. Histopatolojik bulguların derecelendirilmesi

Apoptotik ve Nekrotik Hücreler	
K	-
ALA	-
PKOS	+++
PKOS-ALA	+

Over doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (-/+++)
arası skorlanarak değerlendirilmiştir. apoptotik ve nekrotik hücre
varlığı yok (-), az (+), orta (++) , fazla (+++) olacak şekilde
değerlendirilmiştir.

Over dokusunda incelenen primer folikül sayısı PKOS grubunda tüm gruplara göre anlamlı düzeyde artmıştır (PKOS ile K grubu arasında $p=0,001$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,033$ PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,004$). K, ALA ve PKOS-ALA grupları arasında primer folikül sayısı bakımından anlamlı fark saptanmamıştır. (K ile ALA grubu arasında $p>0,05$, K ile PKOS-ALA grubu arasında $p>0,05$, ALA ile PKOS-ALA grubu arasında $p>0,05$).

PKOS grubunda graaf folikül sayısı bakımından tüm gruplara göre anlamlı düzeyde azalma bulunmuştur (PKOS ile K grubu arasında $p=0,003$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,04$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,02$). K, ALA ve PKOS-ALA grupları arasında graaf folikül sayısı bakımından anlamlı fark saptanmamıştır (K ile ALA grubu arasında $p>0,05$, K ile PKOS-ALA grubu arasında $p>0,05$, ALA ile PKOS-ALA grubu arasında $p>0,05$).

PKOS grubunda korpus luteum sayısı tüm gruplara göre anlamlı düzeyde azalmıştır (PKOS ile K grubu arasında $p=0,041$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,003$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,002$).

PKOS grubunda kistik folikül sayısı tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (PKOS ile K grubu arasında $p<0,001$, PKOS ile ALA grubu arasında $p=0,005$, PKOS ile PKOS-ALA grubu arasında $p=0,041$). PKOS-ALA grubunda

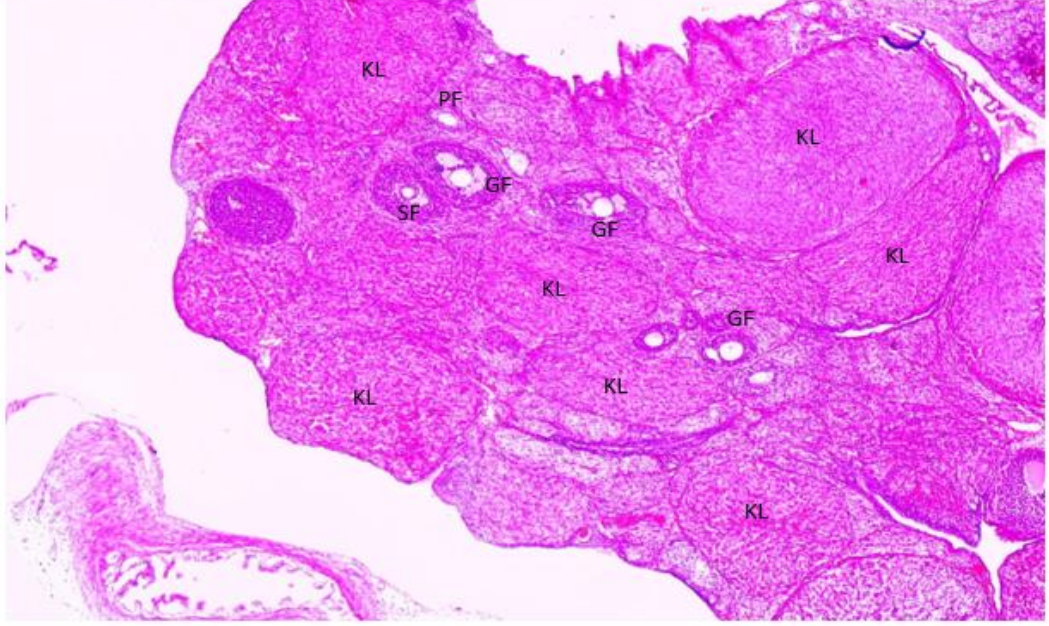
kistik folikül sayısı bakımından K ve ALA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (PKOS-ALA ile K grubu arasında $p=0,024$, PKOS-ALA ile ALA grubu arasında $p=0,024$).

Tablo 4.7. Gruplar arasındaki histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi

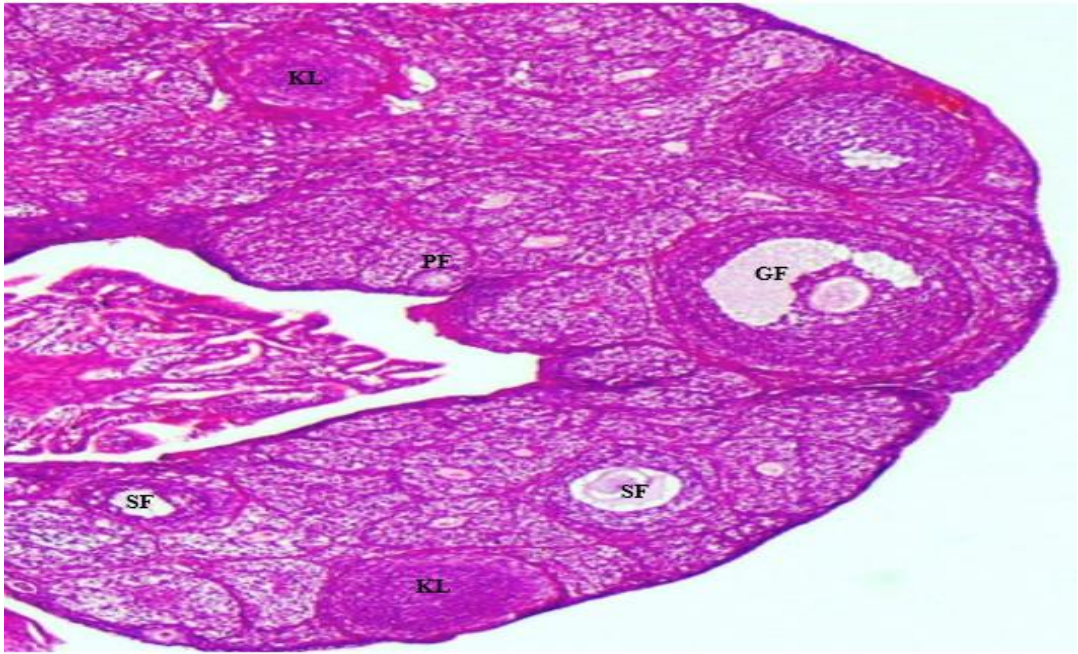
	Primordial Folikül	Primer Folikül	Sekonder Folikül	Graaf Folikül	Korpus Luteum	Kistik Folikül
K	3,87±1,45	4,12±1,24^a	8,75±3,28	3,50±2,56^a	5,12±2,29^a	0^a
ALA	4,00±2,20	4,37±2,32^a	6,37±2,77	4,87±2,41^a	8,2±4,03^a	0^a
PKOS	4,62±2,32	5,62±1,40	6,50±1,60	1,50±0,22	2±0,4	4,62±1,76
PKOS-ALA	3,50±1,30	3,25±1,53^a	4,25±1,66	4,62±2,77^a	8±3,96^a	0,37±0,11^{a,b}

Gruplar arasındaki histopatolojik bulgular Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmektedir. ^a, PKOS grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,05$).

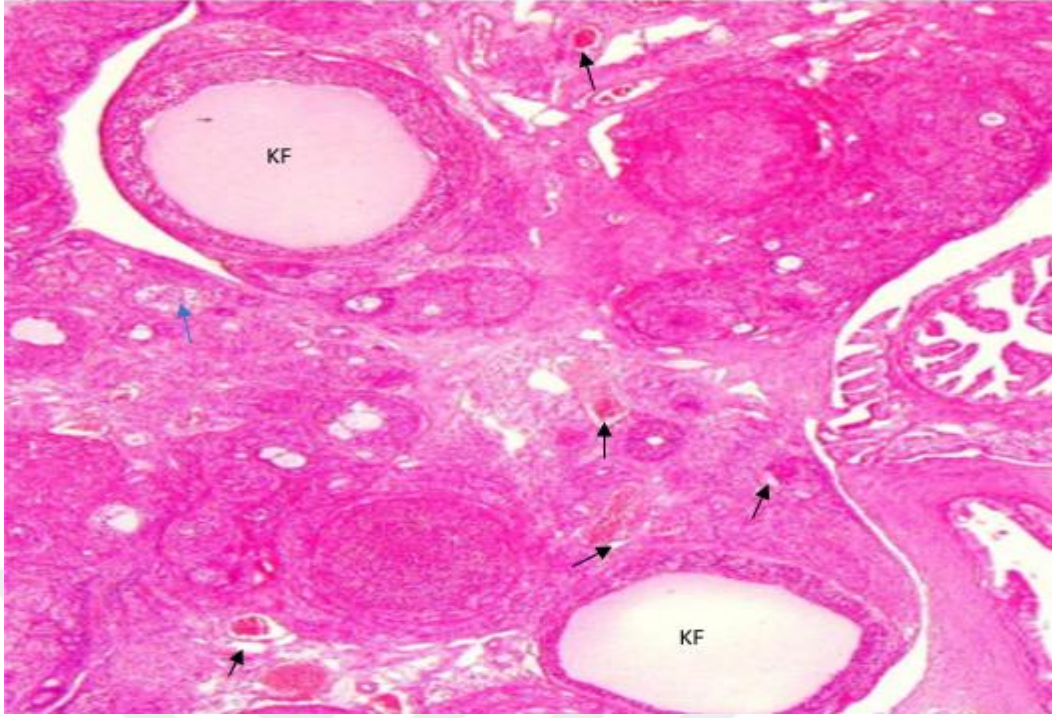
^b, K ve ALA gruplarına göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,05$).



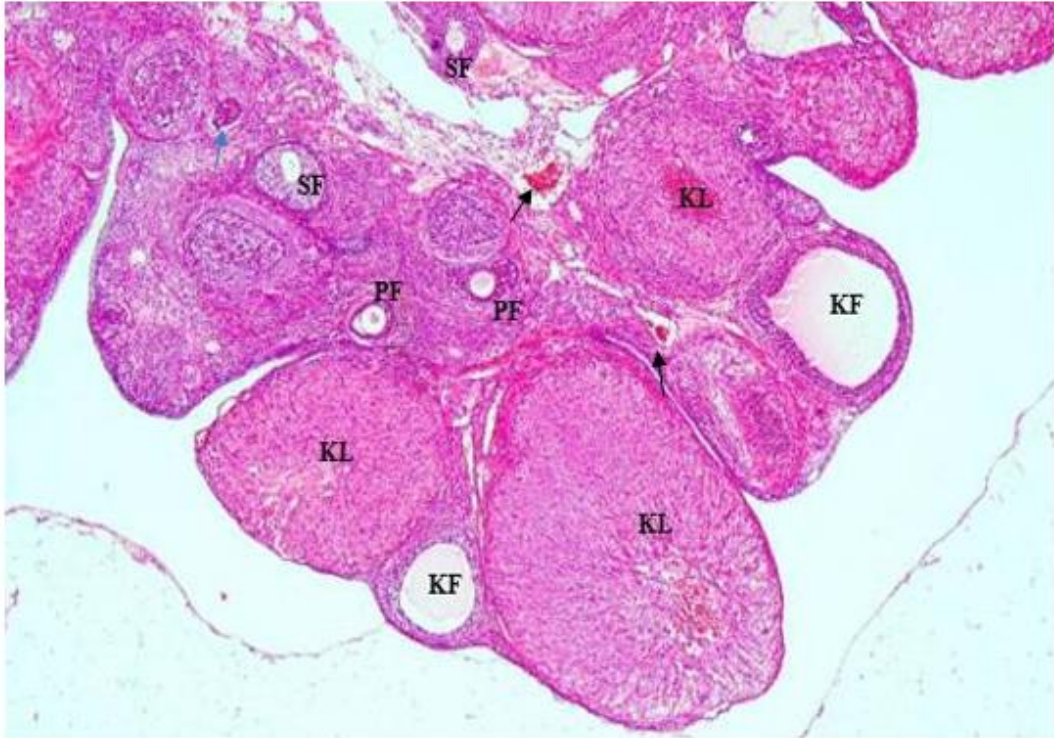
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait over doku kesiti. Farklı büyüme aşamasındaki foliküller ve medulla gözlenmektedir. KL: Korpus luteum, GF: Graaf folikül PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül (H-E, x40).



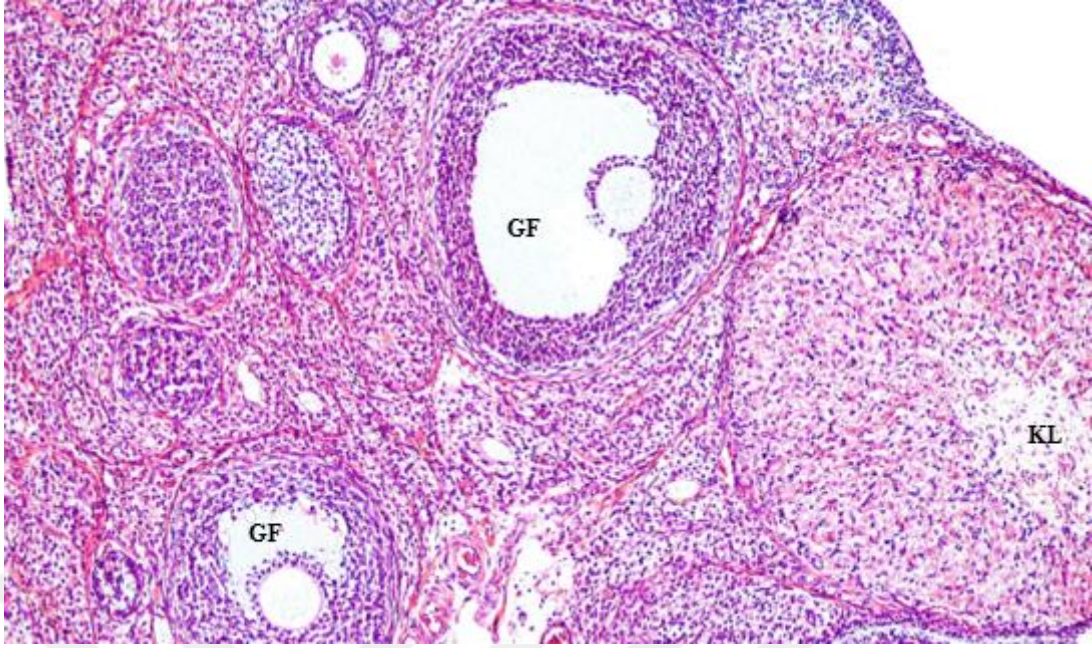
Resim 4.2. ALA grubuna ait over doku kesiti. Farklı büyüme aşamasındaki foliküller ve medulla gözlenmektedir. PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül, GF: Graaf folikül, KL: Korpus luteum (H-E, x100).



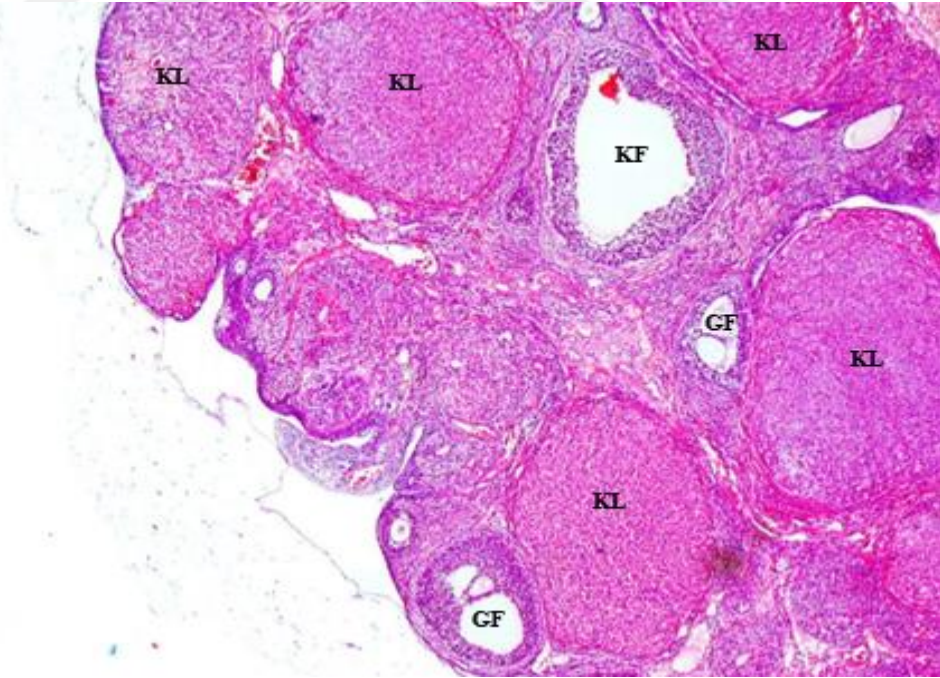
Resim 4.3. PKOS grubuna ait over doku kesiti. KF: Kistik folikül. Siyah ok: Nekrotik hücreler, mavi ok: Apoptotik hücre (H-E, x100).



Resim 4.4. PKOS-ALA grubuna ait over doku kesiti. KF: Kistik folikül, KL: Korpus luteum, PF: Primer folikül, SF: Sekonder folikül. Siyah ok: Nekrotik hücreler, mavi ok: Apoptotik hücre (H-E, x40).



Resim 4.5. Kontrol grubuna ait over doku kesiti. GF: Graaf folikül, KL: Korpus luteum (H-E x200).



Resim 4.6. PKOS-ALA grubuna ait over doku kesiti. KF: Kistik folikül KL: Korpus luteum GF: Graaf folikül (H-E x40).

5. TARTIŞMA

Polikistik over sendromu, kronik seyirli, tüm sistemleri etkileyebilen bir hastalıktır. Üreme çağındaki kadınlarda infertilitenin en sık sebebidir. Yapılan in-vitro çalışmalar hastalığın karmaşık patogenezini aydınlatmada yetersiz kalabilmektedir.

Polikistik over sendromu oluşturulmuş hayvan modelleri, insanlarda görülen bu sendromun kısa sürede taklit edilerek çalışılması ve patofizyolojisinin anlaşılması için kullanışlıdır. PKOS'ta hayvan modelleri sıkça kullanılmakta ve çoğunlukla sendromun reproduktif etkilerini gözlemlemek için yararlı olmaktadır. Sıçan modelleriyle çalışmak kısa östrus döngüsü ve bilinebilir genetik geçmiş bakımından oldukça avantajlıdır. Ancak insanlarla kemirgenler arasında bazı farklılıklar vardır. Kadınlar monoovulatuarken kemirgenler poliovulatuardır. Hipotalamus-hipofiz-over aksı insanlar ve kemirgenler arasında benzer olmasına karşın FSH bağımlı folikül seçim süreci kadınlarda farklıdır (145).

Çalışmamızda in-vivo PKOS sıçan modeli oluşturarak, subkronik ALA kullanımının olası antiinflamatuvar ve histolojik düzeyde etkilerini araştırmayı amaçladık. Androjenlerin, östrojenlerin, aromataz inhibitörlerinin uygulanmasının yanı sıra genetik değişikliklere ve çevresel stres faktörlerine maruz kalma gibi yöntemlerle sıçanlarda deneysel PKOS modelleri oluşturulmaktadır (146). Biz bu amaçla 21 gün boyunca aromataz enzim inhibitörü olan letrozol ile sıçanlarda deneysel PKOS modeli oluşturduk. 21 gün boyunca vajinal smear örnekleri alınarak günlük olarak bakılmıştır. PKOS, uzamış diöstrus fazı ile doğrulanmıştır. Ardından subkronik ALA uygulamasının (4 hafta) bu tabloya etkilerini araştırdık. PKOS grubunda IL-1 β ve IL-18 düzeyleri hem serumda hem over dokusunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş, aynı zamanda over dokusunda IL-1 β ve IL-18 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Dört haftalık ALA uygulaması sonrasında bahsi geçen proinflamatuvar sitokinlerin düzeyleri anlamlı derecede azalmış, kontrol grubu düzeyine kadar gerilemiştir. Ek olarak histolojik değerlendirme sonucunda PKOS'lu sıçanların over dokularında kistik folikül oluşumu artarken korpus luteum azalmıştır. PKOS-ALA grubunun histolojik olarak incelenen over dokularında kistik folikül sayısında anlamlı düzeyde azalma, korpus luteum sayısında anlamlı derecede artış meydana gelmiştir. Bu sonuca göre ALA'nın ovulasyona katkısı

olduğu söylenebilir. Over dokusundaki IL-1 β ve IL-18 gen ekspresyon düzeyleri de tedavi sonucunda anlamlı derecede azalmıştır. Literatürde bu alanda yapılan çalışmalar tarandığında inflamasyonun PKOS patogenezindeki rolü karşımıza çıkmaktadır.

Liu ve arkadaşlarının, PKOS'lu hastaların foliküler sıvısındaki artmış inflamasyonun infertiliteye neden olabileceğini gösterdikleri çalışmalarında, PKOS'lu hastalarda foliküler sıvıdaki IL-18 düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (5).

Dawood ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, obez ve normal kilolu PKOS hastalarında serum IL-18 seviyesi, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (147). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde PKOS grubunda kontrol grubuna göre serum ve over dokusunda IL-18 seviyeleri anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Wang ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, sıçanlara DHEA uygulaması ile deneysel PKOS modeli oluşturulmuştur. Over dokusundan bakılan IL-18 ve IL-1 β seviyeleri, PKOS grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu yükseklik flavonoid grubundan olan baicalin ile tedavi sonrası anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Over dokusunun histolojik incelenmesi sonucunda PKOS grubunda kontrole göre daha yüksek sayıda primer folikül ve kistik folikül gösterilmiştir. Tedavi sonrası hem kistik folikül hem de primer folikülün PKOS grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (148). Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar, bu verileri desteklemektedir.

Di Nicuolo ve arkadaşlarının, tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda yapmış oldukları çalışmada, 2 günde bir 0,8 g ALA tableti 3 ay boyunca kullanan grupta, tedavi almayan hasta grubuna göre histeroskopik biyopsi ile alınan endometrium dokusunda NLRP3 inflamazomunun ekspresyonu ve kaspaz-1 aktivitesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Buna bağlı olarak endometrium dokusunda IL-1 β ve IL-18 düzeyleri anlamlı düzeyde azalmıştır (149). Benzer sonuçlar bizim yapmış olduğumuz çalışmada da gösterilmiştir. PKOS-ALA grubunda, PKOS grubuna göre over dokusundaki IL-18 ve IL-1 β seviyesi azalmıştır. ALA antiinflamatuvar etkisini NLRP3 inflamazomunun aktivitesini azaltarak gösteriyor olabilir.

Wang ve arkadaşlarının, hem PKOS hastalarında hem de letrozol ile indüklenen PKOS fare modelinde yaptıkları çalışmalarında, granüloza hücrelerinde NLRP3 ve kaspaz-1 ekspresyonu kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Eş zamanlı olarak PKOS fare modelinde yaptıkları çalışmada serumda ölçülen IL-18 seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (150). Bizim çalışmamızda da PKOS grubunda IL-18 serum düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Lee ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, astım modeli oluşturulan farelere, 100 mg/kg dozunda 1 hafta boyunca ALA uygulamasının, akciğer dokusunda IL-18 mRNA ekspresyonunu, tedavi almayan astım modeli oluşturulmuş fare grubuna göre anlamlı olarak düşürdüğü bulunmuştur (151).

Refaie ve arkadaşlarının yapmış oldukları, letrozol ile indüklenen PKOS sıçan grubunda diacerinin etkisiyle ilgili yapmış oldukları çalışmada, PKOS grubunda kontrol grubuna göre vücut ağırlıkları yüksek bulunmuştur. Over dokusu histopatolojik olarak incelenmiş ve PKOS grubunda kontrol grubuna göre kistik folikül sayısında artış, korpus luteum sayısında azalma olduğu gösterilmiştir (152).

Nanees ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, letrozol ile indüklenen PKOS sıçan modelinde, kontrol grubuna göre over dokusunda kistik foliküllerin arttığı, korpus luteum sayısının ise azaldığı bulunmuştur (153).

Gao ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, DHT ile indüklenen PKOS sıçan grubunda, kontrol grubuna göre kistik folikül sayısı artmış, korpus luteum sayısı azalmıştır. Ayrıca PKOS grubunda, kontrollere göre vücut ağırlığı daha yüksek bulunmuştur. Tedavi ile vücut ağırlığı anlamlı düzeyde azalmıştır (154).

Huerta ve arkadaşlarının obez kadın hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada, 0,3 g/gün dozunda 10 hafta ALA tablet takviyesi alan grupta, tedavi almayan gruba göre kilo alımı anlamlı düzeyde azalmıştır. ALA takviyesi alan grupta plazma leptin seviyesi takviye almayan hasta grubuna göre anlamlı yüksek çıkmıştır. ALA'nın kilo üzerine etkisi leptin düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir (155). Bizim çalışmamızda da PKOS-ALA grubunda PKOS grubuna göre vücut ağırlığı azalmış olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bağlı olarak, ALA uygulamasının kilo alımını düşürerek, PKOS tedavisinde etkili olacağı söylenebilir.

Hlail ve arkadaşlarının, PKOS'lu kadınlarda yapmış oldukları çalışmada, sağlıklı kadınlara göre serum IL-1 β seviyelerinde anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (156).

Gümüşkaya ve arkadaşlarının, letrozol ile indüklenen PKOS sıçan modelinde 10 günlük tannik asit uygulamasının terapötik etkisiyle ilgili yapmış oldukları çalışmada, PKOS grubunda kilo alımı, kontrol grubuna göre artmıştır. Over histopatolojik değerlendirilmesinde PKOS grubunda, kontrollere göre kistik folikül sayısı artmış, graaf folikül sayısı ise azalmıştır (157). Yapmış olduğumuz çalışmada ki bulgularımız, bu sonuçları desteklemektedir.

Tu ve arkadaşlarının PKOS hastalarında yapmış oldukları çalışmada, Diane-35 ve kombine antioksidan tedavisi alan hastalarda serum TAS değeri PKOS grubuna göre artmış, TOS değeri ve OSI azalmıştır (158).

Mohammed ve arkadaşlarının, valproik asite bağlı karaciğer hasarında alfa lipoik asitin antioksidan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 14 gün 100 mg/kg ALA ile tedavi edilen grupta, karaciğer hasarı oluşmuş gruba göre glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimleri anlamlı olarak artarken malondialdehit seviyeleri anlamlı düzeyde azalmıştır. ALA, Nrf-2 aktivitesini arttırarak bu antioksidan etkiye neden olmuştur (159). Bizim çalışmamızda da PKOS-ALA grubunda, PKOS grubuna göre serum TAS değeri artmış, TOS değeri azalmış bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. OSI düzeyi, istatistiksel olarak anlamlı düşük gelmiştir.

Joksimovic ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, 35 gün boyunca 100 mg/kg testosteron enanthate ile indüklenen PKOS grubunda, kontrollere göre over dokusunda kistik folikül oluşumu meydana gelmiş, korpus luteum oluşumu ise engellenmiştir. Kalp dokusunda ölçülen süperoksit dismutaz ve glutatyon seviyeleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (160). Bizim çalışmamızda PKOS grubunda kontrol grubuna göre serum TOS düzeyleri yüksek bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 21 günlük 1 mg/kg letrozol dozu, bu etki için düşük kalmış olabilir.

Lv ve arkadaşlarının DHEA ile indükledikleri PKOS sıçanlarında, corilagin tedavisinin etkisi ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, PKOS grubunda ortalama over ağırlıkları, kontrollere göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Tedavi edilen PKOS

grubunda, PKOS grubuna göre anlamlı azalmıştır (161). Bizim çalışmamızda da PKOS grubunda, over ağırlıkları kontrollere göre artmıştır. PKOS-ALA grubunda, PKOS'a göre anlamlı azalmıştır. Bu sonuç PKOS'ta artan kistik foliküllere bağlı olarak artmış over hacmi nedeniyle olabilir. ALA etkisiyle kistik folikül sayısı azalarak, over ağırlığı azalmış olabilir.

Qi ve arkadaşlarının, sıçan miyokardında iskemi-reperfüzyon hasarına karşı alfa lipoik asitin koruyucu etkisiyle ilgili yapmış oldukları çalışmada, iskemi-reperfüzyon hasarından 12 saat ve yarım saat önce, hasar oluştuktan yarım saat sonra 30 mg/kg dozunda ALA intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. ALA ile tedavi edilen grupta, iskemi-reperfüzyon oluşmuş gruba göre miyokardiyal apoptoz ve hücre hasarı azalmıştır. ALA, HMGB1/TLR4/NF- κ B yolunu inhibe ederek iskemi-reperfüzyon hasarını engellemiştir. Ayrıca miyokardiyal apoptotik Bax proteinin ekspresyonunu azaltmış, anti-apoptotik etkili Bcl-2 ekspresyonunu arttırmıştır. Bizim çalışmamızda da PKOS-ALA grubunda over dokusunda apoptotik ve nekrotik hücreler, PKOS grubuna göre azalmıştır (162).

Çakır ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, sıçanlara tek doz metotreksat uygulaması ile böbrek hasarı oluşturulmuştur. Alfa lipoik asit 60 mmol/kg dozunda intraperitoneal olarak 5 gün uygulanmıştır. Gruplar metotreksat, kontrol ve metotreksat-alfa lipoik asit olarak ayrılmıştır. Serumda ölçülen IL-1 β seviyeleri, metotreksat-alfa lipoik asit grubunda metotreksat grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır (163).

De Freitas ve arkadaşlarının pilokarpin kaynaklı nöbetlere alfa lipoik asit uygulamasının sıçan hipokampusünde nöroprotektif etkisiyle ilgili yapmış oldukları çalışmada, alfa lipoik asit 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında 2 ayrı gruba intraperitoneal olarak uygulanmıştır. 30 dakika sonra pilokarpin uygulaması yapılmıştır. Alfa lipoik asit 10 mg/kg dozunda uygulanan pilokarpin grubunda ve alfa lipoik asit 20 mg/kg dozunda uygulanan pilokarpin grubunda, tek başına pilokarpin verilen gruba göre hipokampus dokusunda IL-1 β mRNA ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (164).

Sun Q ve arkadaşlarının yapmış oldukları streptozosin ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde alfa lipoik asit uygulamasının periferik nöropatiyi engellediğini

gösterdikleri çalışmalarında, alfa lipoik asit diyabetik sıçanlara 100 mg/kg/gün dozunda 12 hafta boyunca oral yol ile verilmiştir. Alfa lipoik asitle tedavi edilen diyabetik sıçan grubunda, tedavi almayan diyabetik sıçan grubuna göre siyatik sinirdeki NLRP3, IL-1 β ve IL-18 ekspresyon düzeyleri anlamlı düzeyde azalmıştır. Serumdan ölçülen IL-1 β ve IL-18 seviyeleri de anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Pınar ve arkadaşlarının yapmış oldukları endometriozis sıçan modelinde, alfa lipoik asit uygulamasının etkisiyle ilgili yapmış oldukları bir çalışmada, endometriozis oluşmuş sıçanların bir kısmına ALA 100 mg/kg dozunda 14 gün boyunca intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. ALA ile tedavi edilen grupta, hasta grubuna göre serum OSI değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (165).

Koh ve arkadaşlarının obez hasta grubunda yaptıkları bir çalışmada, hastalar 3 ayrı gruba ayrılmıştır. 20 hafta 1200 mg/gün ALA tablet takviyesi alan grup, 20 hafta 1800 mg/gün ALA tablet takviyesi alan grup ve plasebo grubu olarak ayrılan gruplarda tedavi sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırılmıştır. Hem 1200 mg/gün hem de 1800 mg/gün ALA takviyesi alan gruplarda ortalama vücut ağırlıkları, plasebo grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (166).

Kang ve arkadaşlarının yapmış olduğu, sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarı oluşturulmuş farelerde alfa lipoik asitin koruyucu etkisiyle ilgili yapmış oldukları bir çalışmada, ALA 100 mg/kg dozunda 3 gün boyunca günde bir kez intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. Ardından sisplatin uygulaması yapılmıştır. ALA ile tedavi edilen grupta, tedavi almayan gruba göre böbrek dokusunda nekrotik hücrelerin azaldığı bulunmuştur. ALA aynı zamanda böbrek dokusunda NF- κ B aktivasyonunu da azaltmıştır (167).

Jesudason ve arkadaşlarının yapmış olduğu, sistemik inflamasyon oluşturulan farelerde alfa lipoik asitin koruyucu etkisiyle yapmış oldukları çalışmada, farelere gümüş nitrat enjeksiyonu yapılarak sistemik inflamasyon oluşturulmuştur. ALA 100 mg/kg dozunda 4 gün boyunca intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. Farelerin incelenen beyin korteks dokusunda ALA ile tedavi edilen grupta, tedavi almayan gruba göre nekrotik hücreler azalmıştır (168).

Bu sonuçlar, yapmış olduğumuz çalışmamızdaki sonuçları destekler niteliktedir. PKOS'a bağlı inflamasyon sonucu over dokusunda folikül gelişimi

baskılanmış, nekrotik ve apoptotik hücre sayısı artış göstermiştir. ALA ile tedavi bu bulguları tersine çevirerek over dokusunda nekroz ve apoptozu azaltarak folikül gelişimini sağlamıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Polikistik over sendromu, kadınlarda sık görülen ve birçok sistemi etkileyebilen bir sendromdur. Kadın infertilitesinin en sık sebebidir. Ancak etyopatogenezi karmaşık ve kesin olarak bilinmemektedir. Tedavi yöntemleri hala araştırma aşamasındadır. Bu sebeple, PKOS hayvan modelleri oluşturularak, inflamasyon ile ilişkisi ve buna yönelik tedavi yöntemlerinin araştırılması önem taşımaktadır.

Sıçanlarda PKOS modeli oluşturmak için letrozol 21 gün boyunca oral gavaj yolu ile uygulanmıştır. Tüm sıçanlardan günlük olarak vajinal smear alınmıştır. K ve ALA gruplarında östrus döngüsü düzenli bir şekilde birbirini takip etmekteydi. PKOS ve PKOS-ALA gruplarında letrozol uygulamasının son 14 günü uzamış diöstrus fazı meydana gelmiştir. Değerlendirilen vajinal smear sonuçlarına göre bu grupların PKOS oldukları doğrulanmıştır.

PKOS grubunda proinflamatuvar etkili sitokinlerden IL-1beta ve IL-18'in hem over dokusunda hem serumda artışı, hastalığın etiolojisinde inflamasyonun da etkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda over dokusunda bu proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarındaki artış da bu etkiyi desteklemektedir.

Alfa lipoik asit uygulamasının PKOS üzerindeki etkisini değerlendirdiğimizde hem dokuda hem serumda proinflamatuvar etkili sitokinleri anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur. Over dokusundaki ekspresyonlarını da anlamlı düzeyde azaltarak, PKOS tedavisine katkı sağlayabilir. PKOS tedavisinin ilk basamağı yaşam tarzı değişikliği ve kilo kontrolüdür. ALA, vücut ağırlığı üzerinde ki azaltıcı etkisiyle tedaviye katkı sağlayabilir.

PKOS grubunda over dokusundaki artmış kistik folikül sayısı ve azalmış korpus luteum sayısı bu grupta ovulasyonun baskılandığını göstermiştir. ALA ile tedavi kistik folikül sayısında anlamlı bir düşüşe, korpus luteum sayısında anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Böylelikle ALA uygulamasının ovulasyona katkısı olabileceğini söyleyebiliriz.

Histopatolojik değerlendirme sonucunda PKOS 'ta artan nekrotik ve apoptotik hücreler, inflamasyonun bir sonucu olarak meydana gelmiş olabilir. ALA ile tedavi bu etkiyi tersine çevirmiştir.

Verilerimize bağlı olarak ALA'nın PKOS'ta inflamasyona bağlı hasarların azaltılmasında etkili bir tedavi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak hangi doz ve sürede inflamasyon üzerinde olumlu etkisinin olacağına dair veriler için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.



ÖZET

Polikistik Over Sendrom Modelinde Alfa Lipoik Asit Uygulamasının, Ovaryan Histopatoloji, IL-18, IL-1Beta Düzeyleri ve mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Polikistik over sendromu, kadınlarda infertilitenin en sık sebebidir. Patogenezi net olmasada inflamasyonun hastalığın gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, deneysel PKOS oluşturulmuş sıçanlara ALA uygulamasının, IL-1beta, IL-18 düzeylerine ve over dokusundaki histolojik değişikliklere etkisi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Wistar Albino türü 32 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Gruplar K, ALA, PKOS, PKOS-ALA olarak eşit sayıda ayrılmıştır. PKOS ve PKOS-ALA gruplarına, deneyin başladığı gün letrozol 1mg/kg dozunda %1'lik KMS çözeltisinde 2 ml/kg hacminde 21 gün boyunca oral gavaj yolu ile uygulanmıştır. K ve ALA gruplarına eş zamanlı olarak %1 KMS eşit hacimde verilmiştir. Ardından 4 hafta boyunca ALA ve PKOS-ALA gruplarına ALA 100 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulanmıştır. K ve PKOS gruplarına eş zamanlı olarak serum fizyolojik i.p. uygulanmıştır. Over dokusunda sitokinlerin seviyesi ve ekspresyonlarına bakılmıştır. Serumda IL-1beta, IL-18, TAS, TOS düzeylerine bakılmıştır.

PKOS grubunda tüm gruplara göre over dokusunda IL-1beta, IL-18 mRNA ekspresyonları, serum ve dokuda ki düzeyleri anlamlı yüksek bulunmuştur. PKOS'ta tüm gruplara göre kistik folikül sayısı artmış, korpus luteum sayısı ise azalmıştır. Serum OSI düzeyleri ALA tedavisiyle azalmıştır.

Çalışmamızda PKOS'ta görülen inflamasyonun azaltılmasında ALA tedavisinin etkili olabileceğini öngörmekteyiz. Ancak en iyi sonucu alabilmek için doz, sıklık, kullanım süresi ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: ALA, IL-1beta, IL-18, İnflamasyon, PKOS

ABSTRACT

Effects of Alpha Lipoic Acid Administration on Ovarian Histopathology, IL-18, IL-1Beta Levels and mRNA Expressions in Polycystic Ovary Syndrome Model.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common cause of infertility in women. Although its pathogenesis is not fully understood, inflammation has been shown to play a role in the development of the disease. Our study aimed to investigate the effect of ALA administration on IL-1beta, IL-18 levels, and histological changes in ovarian tissue in rats with experimentally induced PCOS

We used 32 female Wistar Albino rats divided into four groups: K, ALA, PCOS, and PCOS-ALA, with equal numbers in each group. Rats in the PCOS and PCOS-ALA groups were orally administered letrozole at a dose of 1mg/kg in a 1% CMC solution at a volume of 2 ml/kg via oral gavage for 21 days, starting from the day the experiment began. Simultaneously, rats in the K and ALA groups were given an equal volume of 1% CMC via oral gavage. Subsequently, rats in the ALA and PCOS-ALA groups were intraperitoneally administered ALA at a dose of 100 mg/kg for 4 weeks, while rats in the K and PCOS groups were intraperitoneally administered physiological saline for the same duration. Cytokine levels and expressions in ovarian tissue were evaluated. IL-1beta, IL-18, TAS, and TOS levels were measured in serum.

In the PCOS group, IL-1beta and IL-18 mRNA expressions in ovarian tissue, as well as their levels in serum and tissue, were significantly higher compared to all other groups. Additionally, the number of cystic follicles increased, while the number of corpus luteum decreased compared to all groups. Serum OSI levels decreased with ALA treatment.

We anticipate that ALA treatment may be effective in reducing inflammation observed in PCOS. However, further studies are needed to optimize dosage, frequency, and duration of treatment to achieve the best results.

Keywords: ALA, IL-1beta, IL-18, Inflammation, PCOS

KAYNAKLAR

1. Barrea L, Frias-Toral E, Verde L, Ceriani F, Cucalón G, Garcia-Velasquez E, et al. PCOS and nutritional approaches: Differences between lean and obese phenotype. *Metabol Open*. 2021;12:100123.
2. Eiras MC, Pinheiro DP, Romcy KAM, Ferriani RA, Reis RMD, Furtado CLM. Polycystic Ovary Syndrome: the Epigenetics Behind the Disease. *Reproductive Sciences*. 2022;29(3):680-94.
3. Kamenov Z, Gateva A. Inositols in PCOS. *Molecules*. 2020;25(23):5566.
4. Armanini D, Boscaro M, Bordin L, Sabbadin C. Controversies in the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of PCOS: Focus on Insulin Resistance, Inflammation, and Hyperandrogenism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(8):4110.
5. Liu Y, Liu H, Li Z, Fan H, Yan X, Liu X, et al. The Release of Peripheral Immune Inflammatory Cytokines Promote an Inflammatory Cascade in PCOS Patients via Altering the Follicular Microenvironment. *Front Immunol*. 2021;12:685724.
6. Siemers KM, Klein AK, Baack ML. Mitochondrial Dysfunction in PCOS: Insights into Reproductive Organ Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(17):13123.
7. Abraham Gnanadass S, Divakar Prabhu Y, Valsala Gopalakrishnan A. Association of metabolic and inflammatory markers with polycystic ovarian syndrome (PCOS): an update. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2021;303(3):631-43.
8. Guarano A, Capozzi A, Cristodoro M, Di Simone N, Lello S. Alpha Lipoic Acid Efficacy in PCOS Treatment: What Is the Truth? *Nutrients*. 2023;15(14):3209.
9. Ying Z, Kampfrath T, Sun Q, Parthasarathy S, Rajagopalan S. Evidence that α -lipoic acid inhibits NF- κ B activation independent of its antioxidant function. *Inflammation research*. 2011;60:219-25.
10. Konrad D, Somwar R, Sweeney G, Yaworsky K, Hayashi M, Ramlal T, et al. The antihyperglycemic drug α -lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes*. 2001;50(6):1464-71.
11. Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*. 2006;12(5):537-55.
12. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:16.
13. Sun YC, Sun XF, Dyce PW, Shen W, Chen H. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int J Biol Sci*. 2017;13(4):449-57.
14. Macklon NS, Fauser BC. Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. *Arch Med Res*. 2001;32(6):595-600.
15. Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;179(1-2):39-46.
16. Williams CJ, Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2024, MDText.com, Inc.; 2000.
17. Draper C, Duisters K, Weger B, Chakrabarti A, Harms A, Brennan L, et al. Menstrual cycle rhythmicity: metabolic patterns in healthy women. *Scientific Reports*. 2018;8(1):14568.

18. Thiyagarajan DK, Basit H, Jeanmonod R. Physiology, menstrual cycle. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
19. Wang J, Wu D, Guo H, Li M. Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome. *Life Sci.* 2019;236:116940.
20. Coutinho EA, Kauffman AS. The Role of the Brain in the Pathogenesis and Physiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Med Sci (Basel).* 2019;7(8).
21. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1935;29(2):181-91.
22. Azziz R, Adashi EY. Stein and Leventhal: 80 years on. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(2):247.e1-e11.
23. Rasquin LI, Anastasopoulou C, Mayrin JV. Polycystic Ovarian Disease. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
24. Wolf WM, Wattick RA, Kinkade ON, Olfert MD. Geographical Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome as Determined by Region and Race/Ethnicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2018;15(11):2589.
25. Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters KA, Campbell RE, Benrick A, Giacobini P, et al. Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev.* 2020;41(4).
26. Caron KM, Soo S-C, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1997;94(21):11540-5.
27. Matteson KJ, Chung BC, Urdea MS, Miller WL. Study of cholesterol side-chain cleavage (20,22 desmolase) deficiency causing congenital lipid adrenal hyperplasia using bovine-sequence P450scc oligodeoxyribonucleotide probes. *Endocrinology.* 1986;118(4):1296-305.
28. de Medeiros SF, Rodgers RJ, Norman RJ. Adipocyte and steroidogenic cell cross-talk in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update.* 2021;27(4):771-96.
29. Ashraf S, Nabi M, Rashid F, Amin S. Hyperandrogenism in polycystic ovarian syndrome and role of CYP gene variants: a review. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2019;20(1):1-10.
30. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006;103(7):2334-9.
31. Lewis GF, Brubaker PL. The discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. *The Journal of clinical investigation.* 2021;131(1).
32. James DE, Stöckli J, Birnbaum MJ. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2021;22(11):751-71.
33. Hubbard SR, Wei L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature.* 1994;372(6508):746-54.
34. Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol.* 2001;11(4):213-21.
35. Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MA, et al. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(12):6403.
36. Ewa Ś, Justyna S, Adam W, Janusz S, Józef D, Agnieszka Ś. Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In: Leszek S, editor. *Blood Glucose Levels.* Rijeka: IntechOpen; 2018. p. Ch. 3.

37. Herman R, Sikonja J, Jensterle M, Janez A, Dolzan V. Insulin Metabolism in Polycystic Ovary Syndrome: Secretion, Signaling, and Clearance. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4).
38. Rojas J, Chávez M, Olivar L, Rojas M, Morillo J, Mejías J, et al. Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth. *Int J Reprod Med.* 2014;2014:719050.
39. Sandhu MS, Gibson JM, Heald AH, Dunger DB, Wareham NJ. Association between insulin-like growth factor-I: insulin-like growth factor-binding protein-1 ratio and metabolic and anthropometric factors in men and women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2004;13(1):166-70.
40. Shaaban Z, Khoradmehr A, Amiri-Yekta A, Nowzari F, Jafarzadeh Shirazi MR, Tamadon A. Pathophysiologic Mechanisms of Insulin Secretion and Signaling-Related Genes in Etiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Genet Res (Camb).* 2021;2021:7781823.
41. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr J.* 2009;56(6):729-37.
42. Garg A, Patel B, Abbara A, Dhillon WS. Treatments targeting neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clinical Endocrinology.* 2022;97(2):156-64.
43. Eng PC, Phylactou M, Qayum A, Woods C, Lee H, Aziz S, et al. Obesity-related Hypogonadism in women. *Endocr Rev.* 2023.
44. Naamneh Elzenaty R, du Toit T, Flück CE. Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2022;36(4):101665.
45. Coyle C, Campbell RE. Pathological pulses in PCOS. *Molecular and cellular endocrinology.* 2019;498:110561.
46. Deligeoroglou E, Kouskouti C, Christopoulos P. The role of genes in the polycystic ovary syndrome: predisposition and mechanisms. *Gynecological Endocrinology.* 2009;25(9):603-9.
47. Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *Appl Clin Genet.* 2019;12:249-60.
48. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine.* 2005;352(12):1223-36.
49. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19(1):41-7.
50. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006;91(11):4237-45.
51. Klein DA, Paradise SL, Reeder RM. Amenorrhea: A Systematic Approach to Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2019;100(1):39-48.
52. Christ JP, Cedars MI. Current Guidelines for Diagnosing PCOS. *Diagnostics.* 2023;13(6):1113.
53. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Norman RJ on behalf of the International PCOS Network. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome.
54. Carmina E. Prevalence of idiopathic hirsutism. *European Journal of Endocrinology.* 1998;139(4):421-3.
55. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Human reproduction update.* 2003;9(6):505-14.

56. Quinn MM, Kao C-N, Ahmad A, Lenhart N, Shinkai K, Cedars MI, et al. Raising threshold for diagnosis of polycystic ovary syndrome excludes population of patients with metabolic risk. *Fertility and Sterility*. 2016;106(5):1244-51.
57. Tripathy P, Sahu A, Sahu M, Nagy A. Metabolic risk assessment of Indian women with polycystic ovarian syndrome in relation to four Rotterdam criteria based phenotypes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;224:60-5.
58. Guastella E, Longo RA, Carmina E. Clinical and endocrine characteristics of the main polycystic ovary syndrome phenotypes. *Fertility and sterility*. 2010;94(6):2197-201.
59. Carmina E, Chu M, Longo R, Rini G, Lobo R. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(5):2545-9.
60. Burger HG. Androgen production in women. *Fertility and sterility*. 2002;77:3-5.
61. Davison SL, Bell R, editors. *Androgen physiology. Seminars in reproductive medicine*; 2006: Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New
62. Yildiz BO, Azziz R. The adrenal and polycystic ovary syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2007;8:331-42.
63. Biernacka-Bartnik A, Kocelak P, Owczarek AJ, Choreza PS, Markuszewski L, Madej P, et al. The cut-off value for HOMA-IR discriminating the insulin resistance based on the SHBG level in women with polycystic ovary syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1100547.
64. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Falcon de Vargas A, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(6):2001-5.
65. Pinola P, Piltonen TT, Puurunen J, Vanky E, Sundström-Poromaa I, Stener-Victorin E, et al. Androgen Profile Through Life in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Nordic Multicenter Collaboration Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;100(9):3400-7.
66. Adashi EY, Hsueh AJW, Yen SSC. Insulin Enhancement of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Release by Cultured Pituitary Cells*. *Endocrinology*. 1981;108(4):1441-9.
67. Sheehan MT. Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res*. 2004;2(1):13-27.
68. Franks S. Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clinical endocrinology*. 1989;31(1):87-120.
69. Rittmaster RS. Treating hirsutism. *The Endocrinologist*. 1993;3(3):211-8.
70. Ruan X, Kubba A, Aguilar A, Mueck A. Use of cyproterone acetate/ethinylestradiol in polycystic ovary syndrome: rationale and practical aspects. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*. 2017;22:1-8.
71. Luan Y-y, Zhang L, Peng Y-q, Li Y-y, Liu R-x, Yin C-h. Immune regulation in polycystic ovary syndrome. *Clinica Chimica Acta*. 2022;531:265-72.
72. Siddiqui S, Mateen S, Ahmad R, Moin S. A brief insight into the etiology, genetics, and immunology of polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Assist Reprod Genet*. 2022;39(11):2439-73.
73. Graf MJ, Richards CJ, Brown V, Meissner L, Dunaif A. The independent effects of hyperandrogenaemia, hyperinsulinaemia, and obesity on lipid and lipoprotein profiles in women. *Clinical Endocrinology*. 1990;33(1):119-31.
74. Bani Mohammad M, Majdi Seghinsara A. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Diagnostic Criteria, and AMH. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(1):17-21.

75. Zhao X, Feng X, Zhao X, Jiang Y, Li X, Niu J, et al. How to screen and prevent metabolic syndrome in patients of PCOS early: Implications from metabolomics. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:659268.
76. Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(4):1929-35.
77. Tabeshpour J, Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. A review of the effects of *Berberis vulgaris* and its major component, berberine, in metabolic syndrome. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(5):557-68.
78. Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends in cardiovascular medicine*. 2020;30(7):399-404.
79. Cascella T, Palomba S, Tauchmanová L, Manguso F, Di Biase S, Labella D, et al. Serum aldosterone concentration and cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(11):4395-400.
80. Salley KE, Wickham EP, Cheang KI, Essah PA, Karjane NW, Nestler JE. Position statement: glucose intolerance in polycystic ovary syndrome—a position statement of the Androgen Excess Society. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(12):4546-56.
81. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7 Suppl):s176-85.
82. Cena H, Chiovato L, Nappi RE. Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020;105(8):e2695-e709.
83. Kort JD, Winget C, Kim SH, Lathi RB. A retrospective cohort study to evaluate the impact of meaningful weight loss on fertility outcomes in an overweight population with infertility. *Fertility and sterility*. 2014;101(5):1400-3.
84. De Giuseppe R, Braschi V, Bosoni D, Biino G, Stanford FC, Nappi RE, et al. Dietary underreporting in women affected by polycystic ovary syndrome: A pilot study. *Nutrition & Dietetics*. 2019;76(5):560-6.
85. Guan C, Rodriguez C, Elder-Odame P, Minhas AS, Zahid S, Baker VL, et al. Assisted reproductive technology: what are the cardiovascular risks for women? Expert review of cardiovascular therapy. 2023;21(10):663-73.
86. Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(5):748-58.
87. Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. *Steroids*. 2013;78(8):782-5.
88. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and sterility*. 2012;97(1):28-38. e25.
89. Meczekalski B, Pérez-Roncero GR, Lopez-Baena MT, Chedraui P, Perez-Lopez FR. The polycystic ovary syndrome and gynecological cancer risk. *Gynecological Endocrinology*. 2020;36(4):289-93.
90. Shamsi M, Ghazavi A, Saedifar AM, Mosayebi G, Pour SK, Ganji A. The immune system's role in PCOS. *Molecular Biology Reports*. 2022;49(11):10689-702.
91. González F. Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids*. 2012;77(4):300-5.

92. Aboeldalyl S, James C, Seyam E, Ibrahim EM, Shawki HE, Amer S. The Role of Chronic Inflammation in Polycystic Ovarian Syndrome-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
93. Duleba AJ, Dokras A. Is PCOS an inflammatory process? *Fertility and sterility.* 2012;97(1):7-12.
94. He Z, Wang Y, Zhuan L, Li Y, Tang Z-o, Wu Z, et al. MIF-mediated NF- κ B signaling pathway regulates the pathogenesis of polycystic ovary syndrome in rats. *Cytokine.* 2021;146:155632.
95. Zhou F, Li C, Zhang SY. NLRP3 inflammasome: a new therapeutic target for high-risk reproductive disorders? *Chin Med J (Engl).* 2020;134(1):20-7.
96. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720-32.
97. Griffin DE. Cytokines and Chemokines. In: Granoff A, Webster RG, editors. *Encyclopedia of Virology (Second Edition).* Oxford: Elsevier; 1999. p. 339-44.
98. Wang Y, Che M, Xin J, Zheng Z, Li J, Zhang S. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2020;131:110660.
99. Hu M, Zhang Y, Li X, Cui P, Sferruzzi-Perri AN, Brännström M, et al. TLR4-associated IRF-7 and NF κ B signaling act as a molecular link between androgen and metformin activities and cytokine synthesis in the PCOS endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2021;106(4):e1022-e40.
100. Popovic M, Sartorius G, Christ-Crain M, editors. *Chronic low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome: is there a (patho)-physiological role for interleukin-1? Seminars in immunopathology;* 2019: Springer.
101. Wiedemann SJ, Trimigliozzi K, Dror E, Meier DT, Molina-Tijeras JA, Rachid L, et al. The cephalic phase of insulin release is modulated by IL-1 β . *Cell metabolism.* 2022;34(7):991-1003. e6.
102. Cen P, Walther C, Finkel KW, Amato RJ. Chapter 3 - Biomarkers in Oncology and Nephrology. In: Finkel KW, Howard SC, editors. *Renal Disease in Cancer Patients: Academic Press;* 2014. p. 21-38.
103. Moghbeli M, Khedmatgozar H, Yadegari M, Avan A, Ferns GA, Ghayour Mobarhan M. Chapter Five - Cytokines and the immune response in obesity-related disorders. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry.* 101: Elsevier; 2021. p. 135-68.
104. Tsutsui H, Yoshimoto T, Okamura H, Nakanishi K. Interleukin-18. In: Henry HL, Norman AW, editors. *Encyclopedia of Hormones.* New York: Academic Press; 2003. p. 493-500.
105. Trøseid M, Arnesen H, Seljeflot I. Chapter 20 - Interleukin-18 in Metabolic Syndrome and Diabetes. In: Bagchi D, Sreejayan N, editors. *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome.* San Diego: Academic Press; 2012. p. 253-64.
106. Rudnicka E, Suchta K, Grymowicz M, Calik-Ksepka A, Smolarczyk K, Duszewska AM, et al. Chronic Low Grade Inflammation in Pathogenesis of PCOS. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7).
107. Zhang H, Wang X, Xu J, Zhu Y, Chen X, Hu Y. IL-18 and IL-18 binding protein concentration in ovarian follicular fluid of women with unexplained infertility to PCOS during in vitro fertilization. *Journal of Reproductive Immunology.* 2020;138:103083.
108. Wang ZY, Gaggero A, Rubartelli A, Rosso O, Miotti S, Mezzanzanica D, et al. Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: evidence for defective processing in tumor cells. *Int J Cancer.* 2002;98(6):873-8.
109. Berkson B. Thiocetic acid in treatment of hepatotoxic mushroom (Phalloides) poisoning. 1979.

110. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790(10):1149-60.
111. Othman AI, El-Missiry MA, Koriem KM, El-Sayed AA. Alfa-lipoic acid protects testosterone secretion pathway and sperm quality against 4-tert-octylphenol induced reproductive toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;81:76-83.
112. Karaca EG. Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 2008;8(1):231-45.
113. Kastaniotis AJ, Autio KJ, Kerätär JM, Monteuuis G, Mäkelä AM, Nair RR, et al. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(1):39-48.
114. Mayr JA, Feichtinger RG, Tort F, Ribes A, Sperl W. Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37(4):553-63.
115. Solmonson A, DeBerardinis RJ. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(20):7522-30.
116. Storm J, Muller S. Lipoic Acid Metabolism of Plasmodium - A Suitable Drug Target. *Current pharmaceutical design*. 2012;18:3480-9.
117. Erdi MF. Alfa lipoik asidin deneysel subaraknoid kanama ve vazospazmda lipid peroksidasyonu, antioksidan durum ve endotelial apoptoz üzerine etkileri. 2009.
118. Villavicencio Tejo F, Quintanilla RA. Contribution of the Nrf2 Pathway on Oxidative Damage and Mitochondrial Failure in Parkinson and Alzheimer's Disease. *Antioxidants*. 2021;10(7):1069.
119. Laher I. Diabetes and Alpha Lipoic Acid. *Frontiers in Pharmacology*. 2011;2.
120. Genazzani A, Shefer K, Della Casa D, Prati A, Napolitano A, Manzo A, et al. Modulatory effects of alpha-lipoic acid (ALA) administration on insulin sensitivity in obese PCOS patients. *Journal of endocrinological investigation*. 2018;41:583-90.
121. Martins-Green M, Saeed S. Chapter 2 - Role of oxidants and antioxidants in diabetic wound healing. In: Bagchi D, Das A, Roy S, editors. *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*: Academic Press; 2020. p. 13-38.
122. Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, Grasso S, Tomassoni D, Anfuso CD, et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflammation Research*. 2017;66(11):947-59.
123. Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical pharmacology*. 1995;50(1):123-6.
124. Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. Diabetic polyneuropathy in type 2 diabetes mellitus: inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. *Journal of diabetes research*. 2016;2016.
125. Ying Z, Kampfrath T, Sun Q, Parthasarathy S, Rajagopalan S. Evidence that α -lipoic acid inhibits NF- κ B activation independent of its antioxidant function. *Inflamm Res*. 2011;60(3):219-25.
126. Petca A, Bot M, Maru N, Calo IG, Borisavski A, Dumitrascu MC, et al. Benefits of α -lipoic acid in high-risk pregnancies (Review). *Exp Ther Med*. 2021;22(5):1232.
127. Capece U, Moffa S, Improta I, Di Giuseppe G, Nista EC, Cefalo CMA, et al. Alpha-Lipoic Acid and Glucose Metabolism: A Comprehensive Update on Biochemical and Therapeutic Features. *Nutrients*. 2022;15(1).

128. Calabrese EJ, Agathokleous E, Dhawan G, Kapoor R, Calabrese V. Protective effects of alpha lipoic acid (ALA) are mediated by hormetic mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 2023;177:113805.
129. Anthony RM, MacLeay JM, Gross KL. Alpha-Lipoic Acid as a Nutritive Supplement for Humans and Animals: An Overview of Its Use in Dog Food. *Animals (Basel)*. 2021;11(5).
130. Zhang Y, Zhao W, Xu H, Hu M, Guo X, Jia W, et al. Hyperandrogenism and insulin resistance-induced fetal loss: evidence for placental mitochondrial abnormalities and elevated reactive oxygen species production in pregnant rats that mimic the clinical features of polycystic ovary syndrome. *J Physiol*. 2019;597(15):3927-50.
131. Chen Z, Zhong H, Wei J, Lin S, Zong Z, Gong F, et al. Inhibition of Nrf2/HO-1 signaling leads to increased activation of the NLRP3 inflammasome in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):300.
132. Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2013;19(3):268-88.
133. Rose BI, Brown SE. A review of the physiology behind letrozole applications in infertility: are current protocols optimal? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020;37(9):2093-104.
134. Buzdar AU. Aromatase inhibitors in breast cancer therapy. *Clinical breast cancer*. 2003;4:S84-S8.
135. Casper RF. Letrozole: ovulation or superovulation? *Fertility and sterility*. 2003;80(6):1335-7.
136. Bhatnagar AS. The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast cancer research and treatment*. 2007;105(Suppl 1):7-17.
137. Tani H, Shitara Y, Horie T. Population pharmacokinetic analysis of letrozole in Japanese postmenopausal women. *European journal of clinical pharmacology*. 2011;67:1017-25.
138. Ewer MS, Glück S. A woman's heart: the impact of adjuvant endocrine therapy on cardiovascular health. *Cancer*. 2009;115(9):1813-26.
139. Lee YH, Yang H, Lee SR, Kwon SW, Hong E-J, Lee HW. Welsh onion root (*Allium fistulosum*) restores ovarian functions from letrozole induced-polycystic ovary syndrome. *Nutrients*. 2018;10(10):1430.
140. Kafali H, Iriadam M, Ozardalı I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Archives of Medical Research*. 2004;35(2):103-8.
141. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 2007;80(2):84-97.
142. Long JA, Evans HM. *The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena*: University of California Press; 1922.
143. Grasso P, Rozhavskaia M, Reichert Jr LE. In Vivo Effects of Human Follicle-Stimulating Hormone-Related Synthetic Peptide hFSH-, β -(81–95) and Its Subdomain hFSH- β -(90–95) on the Mouse Estrous Cycle. *Biology of reproduction*. 1998;58(3):821-5.
144. Hubscher C, Brooks D, Johnson J. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & histochemistry*. 2005;80(2):79-87.
145. Maliqueo M, Benrick A, Stener-Victorin E, editors. *Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions*. *Seminars in reproductive medicine*; 2014: Thieme Medical Publishers.

146. Furat Rencher S, Kurnaz Ozbek S, Eraldemir C, Sezer Z, Kum T, Ceylan S, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. *Journal of Ovarian Research*. 2018;11(1):55.
147. Dawood A, Alkafrawy N, Saleh S, Noreldin R, Zewain S. The relationship between IL-18 and atherosclerotic cardiovascular risk in Egyptian lean women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(4):294-7.
148. Wang W, Zheng J, Cui N, Jiang L, Zhou H, Zhang D, et al. Baicalin ameliorates polycystic ovary syndrome through AMP-activated protein kinase. *J Ovarian Res*. 2019;12(1):109.
149. Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Castellani R, Rossi ED, Masciullo V, Specchia M, et al. Effect of alpha-lipoic acid and myoinositol on endometrial inflammasome from recurrent pregnancy loss women. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2019;82(3):e13153.
150. Wang B, Shi M, Yu C, Pan H, Shen H, Du Y, et al. NLRP3 Inflammasome-dependent Pathway is Involved in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive Sciences*. 2024;31(4):1017-27.
151. Lee KS, Kim SR, Park SJ, Min KH, Lee KY, Jin SM, et al. Antioxidant down-regulates interleukin-18 expression in asthma. *Mol Pharmacol*. 2006;70(4):1184-93.
152. Refaie MMM, El-Hussieny M, Abdelraheem WM. Diacerein ameliorates induced polycystic ovary in female rats via modulation of inflammasome/caspase1/IL1 β and Bax/Bcl2 pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2022;395(3):295-304.
153. Nannes F, Khalil SS, Hanim M, Mohamed A. Effect of Selenium on Ovarian Structure, Function and Serum Osteopontin Level in Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *The Medical Journal of Cairo University*. 2018;86(September):2435-45.
154. Gao Z, Ma X, Liu J, Ge Y, Wang L, Fu P, et al. Troxerutin protects against DHT-induced polycystic ovary syndrome in rats. *Journal of Ovarian Research*. 2020;13(1):106.
155. Huerta AE, Navas-Carretero S, Prieto-Hontoria PL, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Effects of α -lipoic acid and eicosapentaenoic acid in overweight and obese women during weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(2):313-21.
156. Hlail ZA, AbdMohammed KI, Abdulmir AS, Salman MO. Immunological and molecular detection of Interleukin-1 β (IL-1 β) in Iraqi Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(6):8788-92.
157. Gumuskaya F, Sapmaz T, Canbaz HT, Topkaraoglu S, Sevgin K, Tekayev M, et al. Therapeutic Potential of Tannic Acid in the Management of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) in Letrozole Induced Rat Model: A Histological and a Biochemical Study. *Hamidiye Medical Journal*. 2022;3(2).
158. Tu A-S, Zhong Y, Mao X-G. [Changes of serum TOS and TAS levels and their association with apolipoprotein(a) in patients with polycystic ovary syndrome and infertility]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2016;36(3):405-9.
159. Mohammed MA, Gharib DM, Reyad HR, Mohamed AA, Elroby FA, Mahmoud HS. Antioxidant and anti-inflammatory properties of alpha-lipoic acid protect against valproic acid-induced liver injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021;99(5):499-505.
160. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, et al. Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:8862878.
161. Lv B, Li X, Wang H. Corilagin decreases insulin resistance in polycystic ovary syndrome rat model through regulating AMPK/GSK3 β pathway. *Translational Cancer Research*. 2020;9(5):3242-8.
162. Qi B, Zheng Y, Gao W, Qi Z, Gong Y, Liu Y, et al. Alpha-lipoic acid impedes myocardial ischemia-reperfusion injury, myocardial apoptosis, and oxidative stress by regulating HMGB1 expression. *Eur J Pharmacol*. 2022;933:175295.

163. Çakır T, Polat C, Baştürk A, Gül M, Aslaner A, Durgut H, et al. The effect of alpha lipoic acid on rat kidneys in methotrexate induced oxidative injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(11):2132-9.
164. de Freitas RM, Gomes KN, Saldanha GB. Neuropharmacological effects of lipoic acid and ubiquinone on the mRNA level of interleukin-1 β and acetylcholinesterase activity in rat hippocampus after seizures. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011;25(3):354-61.
165. Pınar N, Soylu Karapınar O, Özcan O, Özgür T, Bayraktar S. Effect of alpha-lipoic acid on endometrial implants in an experimental rat model. *Fundamental & clinical pharmacology.* 2017;31(5):506-12.
166. Koh EH, Lee WJ, Lee SA, Kim EH, Cho EH, Jeong E, et al. Effects of Alpha-Lipoic Acid on Body Weight in Obese Subjects. *The American Journal of Medicine.* 2011;124(1):85.e1-.e8.
167. Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, et al. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;24(10):3012-20.
168. Jesudason EP, Masilamoni JG, Jebaraj CE, Paul SFD, Jayakumar R. Efficacy of DL- α lipoic acid against systemic inflammation-induced mice: antioxidant defense system. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2008;313(1):113-23.



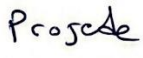
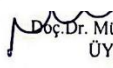
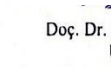

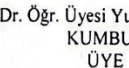
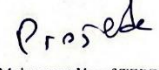
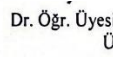
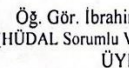
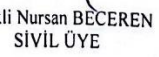
EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
08.06.2023	06	179

SDÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 08.06.2023 tarihinde saat-10:00'da toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;

Karar:179
Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Duygu Kumbul DOĞUÇ (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D) Yürütüçülüğünde,
Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Duygu Kumbul DOĞUÇ, Arş.Gör. Dr.Eltaf DOĞAN KIRAN, Uzm. Dr. Mehmet KIRAN ve Dr Öğr Üyesi Muhammet Yusuf Tepebaşı'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı "Polikistik over sendrom modelinde alfa lipoik asit uygulamasının, ovaryan histopatoloji, IL18, IL1β düzeyleri ve mRNA ekspresyonları üzerine etkisi" başlıklı SDÜ bilimsel araştırma projesi etik kurulumuzca oybirliği ile UYGUNLUĞUNA karar verilmiştir.

 Doç. Dr. Kanat GÜLLE Başkan	 Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE
 Doç. Dr. Müge ÇINA ÜYE	 Doç. Dr. Ömer ÇELİK ÜYE	 Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Soner ÖZCAN ÜYE
 Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Çağdaş KUMBUL ÜYE	 Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Yusuf TEPEBAŞI ÜYE	 Dr. Öğr. Üyesi Mesut ERGAN ÜYE
 Öğ. Gör. İbrahim ONARAN (HÜDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE	KATILMADI Vet. Hekim Aysegül AVŞAR SİVİL ÜYE	 Emekli Nursan BECEREN SİVİL ÜYE