



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN POLİKİSTİK
OVER MODELİNDE YAP/TAZ İNHİBİTÖRÜ
VERTEPORFİN'İN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. YİĞİTCAN ÇİFTÇİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN-2022

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN POLİKİSTİK
OVER MODELİNDE YAP/TAZ İNHİBİTÖRÜ
VERTEPORFİN'İN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. YİĞİTCAN ÇİFTÇİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN 2022

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-21015** proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında maddi manevi katkı sağlayan ve fikirlerini paylaşan, uzmanlık eğitimim sürecinde bana daima yardımda bulunan, iyi bir araştırmacı ve histoloji ve embriyoloji uzmanı olmamda yardımcı olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Kemal ERGİN'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi boyunca eğitimime katkıda bulunan, meslek hayatıma beni en iyi şekilde hazırlayan başta değerli hocam sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN olmak üzere sayın Prof. Dr. Recep KUTLUBAY, Doç. Dr. H. Kübra BAŞALOĞLU, Doktor Öğretim Üyesi K. Murat GÜRSES, Doktor Öğretim Üyesi Erkan GÜMÜŞ hocalarıma teşekkür ederim.

Tez sürecinde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında biyokimya analizlerimde yardımını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Mustafa YILMAZ'a ve diğer biyokimyasal analizler için benden yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Burçin ABAS'a teşekkür ederim.

Tez süresince her zaman yanımda olan ve deneylerimde ve günlük hayatta bana yardımını hiç esirgememiş sevgili arkadaşım Biyofizik Anabilim Dalı/Nörofizyoloji doktora öğrencisi Fulya YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez süresince bana gerek çalışmada gerek günlük hayatta her zaman yardımcı olan başta sevgili arkadaşlarım Araş Gör. Celal Can GÜNGÖR, Damla DEMİRKAYA, Ece ERAYDIN, Esra GÖKMEN; Yüksek Lisans Öğrencileri Burak TOZUN ve Eda ALTIN olmak üzere tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca varlıklarıyla hep yanımda olan ve ömürleri boyunca olacak olan sevgili anneme ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryumun Yapısı, Anatomisi ve Embriyolojisi.....	3
2.2. Folikül Gelişimi.....	6
2.2.1 Primordial Foliküller	6
2.2.2 Primer Foliküller	6
2.2.3 Sekonder Foliküller	8
2.2.4 Tersiyer (Olgun) Foliküller.....	8
2.3 Ovulasyon.....	9
2.3.1 Corpus Luteum	9
2.4 Atrezi	10
2.5 Polikistik Over Sendromu (PKOS)	11
2.5.1 Polikistik Over Sendromu Etyolojisi ve Patofizyolojisi.....	12
2.5.1.1 Hiperinsülinemi	12
2.5.1.2 Hiperandrogenizm	13
2.5.1.3 Obezite.....	13

2.5.2 Tedavi	14
2.5.2.1 Diyet ve Fiziksel Aktivite	14
2.5.1.2 Farmakolojik Tedavi	15
2.6 Yes-Associated Protein 1 (YAP1) ve PKOS İlişkisi	15
2.7 Verteporfin	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	17
3.2 Deney Gruplarının Planlanması.....	17
3.3 Letrozol Uygulanması	17
3.4 Verteporfin Uygulanması.....	17
3.5 Vücut Ağırlığı Tartımı	18
3.6 Deneyin Sonlandırılması	18
3.7 Doku Takibi	18
3.8 Histokimyasal Boyamalar	19
3.9 İmmünohistokimya protokolü	21
3.10 Hormon Analizleri	23
3.11 İstatistiksel Analiz.....	24
3.11.1 Vücut Ağırlıkları ve Over Ağırlıkları Analizleri.....	24
3.11.2 Histokimyasal Analizler.....	24
3.11.3 İmmünohistokimyasal Analizler	26
3.11.4 Biyokimyasal Analizler	26
4. BULGULAR	27
4.1 Histokimyasal Bulgular	27
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular	34

4.3 Vücut ve Over Ağırlıkları	43
4.4 Biyokimya Hormon Analizleri	45
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
ÖZET	53
SUMMARY	54
KAYNAKLAR.....	55
EK:1 ETİK KURUL KARARI.....	67



KISALTMALAR DİZİNİ

AMH:	Anti Müllerian Hormon
AMP:	Adenozin Monofosfat
BTRC:	E3 Ubikuitin Protein Ligaz içeren tekrarlayan beta transdusin
cAMP:	Siklik Adenozin Monofosfat
CMC:	Karboksi metil selüloz
CREB:	cAMP Yanıt Ögesi Bağlama Proteini
CVD:	Kardiyovasküler hastalık
DHEA:	Dehidroepiandrosteron
DHT:	Dihidrotestosteron
DM:	Diabetes Mellitus
DMSO:	Dimetilsülfoksit
E1:	Estron
E2:	Estradiol
E3:	Estriol
EDTA:	Etilendiaminetetraasetik asit
ERK1/2:	Ekstrasellüler regüle kinaz-1/2
FSH:	Folikül Stimüle Edici Hormon
FFA:	Serbest Yağ Asidi
GABA:	Gamma amino bütirik asit
GnRH:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GWAS:	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
H&E:	Hematoksilen-Eozin
hCG:	İnsan Koryonik Gonadotropini
HPA:	Hipotalamo pitiüter adrenal aks
HPG:	Hipotalamo pitiüter gonadal aks
IGF-I:	İnsülin Benzeri Growth Faktör-1
IGF-II:	İnsülin Benzeri Growth Faktör-2
IGFBP1:	İnsülin benzeri büyüme hormonu bağlayıcı protein
IRS-1:	İnsülin reseptörü substratı 1
KAH:	Konjenital Adrenal Hiperplazi

LH: Luteinizan Hormon
MT: Masson-Trikrom
NBF: Nötral Tamponlu Formalin
NLC: Nanopartikül lipid taşıyıcılar
NPPC: Natriüretik peptit öncüsü tip C
NPR2: Natriüretik peptit reseptör 2
PKOS: Polikistik Over Sendromu
PDT: Fotodinamik Terapi
PBS:Fosfat Tamponlu Salin)
PKA: Fosfokinaz A
StAR:Steroid Akut Düzenleyici Proteini
SER: Düz endoplazmik retikulum
SHBG: Seks hormonu bağlayıcı globulin
TAZ: PDZ bağlanma motifli transkripsiyonel koaktivatör
TEAD: TEA-domain aile üyesi proteini
VKİ:Vücut Kitle İndeksi
YAP1: Yes-associated (Yes ilişkili) Protein 1
ZP:Zona Pellusda
ZP-1/2/3/4: Zona Pellusida Sperm Bağlayıcı Protein-1/2/3/4

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1:** Kontrol grubu over dokusu H & E boyaması x5
- Resim 2:** Kontrol grubu over dokusu H&E boyaması x10
- Resim 3:** PKOS grubu over dokusu H & E boyaması. x5
- Resim 4:** PKOS grubu over dokusu H & E boyaması. x10
- Resim 5:** Verteporfin grubu over dokusu H & E boyaması. x5
- Resim 6:** Verteporfin grubu over dokusu H & E boyaması. X10
- Resim 7:** Kontrol grubu over dokusu MT boyaması. x5
- Resim 8:** Kontrol grubu over dokusu MT boyaması. x10
- Resim 9:** PKOS grubu over dokusu MT boyaması.x5
- Resim 10:** PKOS grubu over dokusu MT boyaması.
- Resim 11:** Verteporfin grubu over dokusu MT boyaması.
- Resim 12:** Verteporfin grubu over dokusu MT boyaması.
- Resim 13a:** Kontrol grubu over dokusu anti-YAP1 immunhistokimya boyaması(x5)
- Resim 13b:** Kontrol grubu over dokusu anti-YAP1 boyaması ile görüntülenen bir tersiyer folikül.x20
- Resim 13c:** Kontrol grubu over dokusu anti-YAP1 boyaması ile görüntülenen bir sekonder folikül (x20)
- Resim 14a:** PKOS grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması (x5).
- Resim 14b:** PKOS grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir tersiyer folikül (x20)
- Resim 14c:** PKOS grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir kistik yapı (x20)
- Resim 15a:** Verteporfin grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması. (x5)
- Resim 15b:** Verteporfin grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir tersiyer folikül (x20)
- Resim 15c:** Verteporfin grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir kistik yapı (x20)
- Resim 16a:** Kontrol grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması. (x5)
- Resim 16b:** Kontrol grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir tersiyer folikül (x20)

Resim 16c: Kontrol grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir sekonder follikül yapısı (x20)

Resim 17a: PKOS grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması. (x5)

Resim 17b: PKOS grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir tersiyer folikül (x20)

Resim 17c: PKOS grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir kistik yapı (x20).

Resim 18a: Verteporfin grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması. (x5)

Resim 18b: Verteporfin grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir tersiyer folikül (x20)

Resim 18c: Verteporfin grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenen bir kistik yapı (x20)

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I: Doku takip protokolü

Tablo II: Hematoksilen-eozin boyama protokolü

Tablo III: Masson Trikrom boyama protokolü

Tablo IV: Preparatların immunhistokimyasal boyama protokolü

Tablo IVa: Over Night öncesi

Tablo IVb: Over Night sonrası

Tablo V: 3 preparattan sayılan kist sayılarının gruplara göre ortalamaları ve standart sapmaları

Tablo VI: Pozitif Hücre Çekirdeği Sayılarının Ortalamaları, Standart Sapmaları ve One Way ANOVA Analizi

Tablo VII: Kontrol ve PKOS Grupları Arasındaki Pozitif Çekirdek Sayısı Student's t-Test Analizi

Tablo VII: Kontrol ve Verteporfin Grupları Arasındaki Student's t-Test Analizi

Tablo IX: PKOS ve Verteporfin Grupları Arasındaki Student's t-Test Analizi

Tablo X: Kistik Yapılarda Pozitif Boyanan Hücre Çekirdeği Sayıları

Tablo XI: Vücut ağırlığı ortalamalarının deney haftalarına göre değişimi

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Vücut ağırlıklarının haftalara göre karşılaştırmasını gösteren çizgi grafik

Şekil 2: Üç grup arasındaki 3. Hafta vücut ağırlığı karşılaştırmasını gösteren boxplot grafiği

Şekil 3: Sağ Over Ağırlığı boxplot Grafiği

Şekil 4: Sol Over Ağırlığı boxplot Grafiği

Şekil 5: FSH seviyeleri boxplot Grafiği

Şekil 6: Östradiol Seviyeleri boxplot Grafiği

Şekil 7: Testosteron Seviyeleri boxplot Grafiği



EKLER

EK 1 : Etik Kurul Kararı



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan endokrin bozukluklardan biridir. Yapılan araştırmalarla PKOS prevalansının %4 ile %20 arasında değiştiği bulunmuştur(1). PKOS'un etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır, ancak genetik ve yaşam tarzı faktörlerinin etiyolojiyi etkilediği ve insülin direncinin PKOS patogenezinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. İnsülin direncinin PKOS'lu kadınlarda prevalansının %35-%80 olduğu belirtilmiştir. İnsülin direnci abdominal obezite ile ilişkilendirilmiştir. Öyle ki, ince vücut yapılı PKOS'lu kadınlarda bile abdominal obezite ve bununla ilişkili olarak insülin direnci görülmektedir(2).

PKOS'un varlığı birçok sistemi doğrudan etkilemektedir. PKOS'a eşlik eden insülin direnci obezite, tip 2 diabetes mellitus (DM), dislipidemi, hipertansiyon, metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalık (CVD) için artmış risk anlamına gelmektedir(3). Hiperandrojenizme maruziyet, insülin direnci ve hiperinsülinemi ile doğrudan bağlantılıdır(4). Hiperinsülineminin yanı sıra PKOS'un bir diğer ayırt edici özelliği, ovaryan steroidogenezinin, foliküler dinamikleri ve ovulasyonu kontrol eden gonadotropinlerin, luteinizan hormon (LH) ve follikül stimüle edici hormonun (FSH) düzensiz sekresyonunun varlığıdır. Artan dolaşımdaki LH seviyeleri, artmış LH: FSH oranları ve azalmış veya normal FSH seviyeleri görülür (5). Yüksek LH atım (pulse) frekansı tipik olarak PKOS'lu kadınlarda tanımlanmıştır (6).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, gonadotropin sekresyonu, gonadotropin etkisi, ovaryan foliküler gelişimi ve insülin duyarlılığında rol oynayan genlere çok yakın ilgi çekici lokuslar belirlemiştir. Foliküler büyümenin başlangıç aşamaları (antral süreç) gonadotropinlerden bağımsızdır. Gonadotropinlerin aksine bu evrede otokrin, parakrin ve lokal endokrin faktörler etki göstermektedir(7). Gelişmekte olan ve dormant kalan foliküller arasında dinamik bir denge mevcuttur. PKOS'ta anti-Müllerian hormon (AMH) ve FSH arasındaki denge bozularak artan androjen seviyeleri ve foliküler gelişimde durmaya neden olmaktadır (8). Aşırı salgılanan LH, teka hücrelerini androjen sentezine yönlendirir, ancak FSH konsantrasyonları ve androjenlerin aromataz enzimleri estradiole dönüşümü yetersizdir, bu da dominant bir folikülün seçimini engeller ve dolayısıyla kronik anovülasyona ortaya çıkar(9).

Hippo-YAP sinyal yolağı, hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenleyen bir yoldur. Bu yolak içinde, Yes ile ilişkili protein 1 (YAP1), Hippo-YAP yolağının negatif düzenleyicisidir ve YAP1, Hippo-YAP sinyal yolunun bir transkripsiyon koaktivatörü olarak görev yapar (10). YAP1, granüloza hücrelerinde proliferasyonda ve estradiol sentezinde önemli bir rol oynamaktadır(11) . Ancak, ovulasyon sırasında ise LH tarafından YAP1'in inaktive edilmesi gerekmektedir. Bu yolla granüloza hücreleri proliferasyonunu sonlandır ve granüloza hücrelerinin farklılaşmaları ve luteal faza hazırlanmaları sağlanır. Bu yüzden YAP1 in baskılanması ovulasyonun tamamlanması için gerekli bir adımdır(12).

Verteporfin, bir benzoporfirin türevidir yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi durumlarla ilişkili gözdeki anormal kan damarlarını ortadan kaldırmak için fotodinamik tedavide kullanılmıştır(13). Aynı zamanda YAP-TEAD etkileşimini bozan bir YAP antagonisti olarak çalışır; meme ve mesane kanserlerinde bu etkisi kanser hücrelerinde YAP'ı inhibe ederek regresyon sağlamasıyla gösterilmiştir(14)(15). Ayrıca meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda YAP1 inhibisyonunun kemoterapiye duyarlılığı arttırdığı bulunmuştur (15). Melanoma hücrelerinde de in vitro ortamda hücre hatlarında proliferasyonu azalmasına rağmen oluşturulan fare modelinde melanoma tümörlerinde regresyon gösterilememiştir(16). Ewing sarkomunda da metastatik potansiyeli azalttığı görülmüştür(17).

Tüm bu yapılan çalışmalar ve bulgular ışığında biz de çalışmamızda PKOS deney modelinde YAP1'in verteporfin ile inhibisyonu sonrası over dokusunda, histolojik düzeydeki ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimleri araştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumun Yapısı, Anatomisi ve Embriyolojisi

Tipik olarak overler, ovarian fossa içinde bulunurlar ve tuba uterinalara komşuluk gösterirler. Ovaryan fossa, eksternal iliak arter ve internal iliak arterin bifurkasyonu ile oluşan bölgeyi tarif etmektedir. Overlerin ön tarafı umbilikal medial ligament bulunmaktadır. Arkada tarafında ise üreter ve internal iliak arterler bulunur (18).

Nuliparalarda (çocuk doğurmamış kadınlarda), yumurtalıklar (ovaryumlar) pembemsi beyaz yapıdadır. Boyutları yaklaşık 3 cm uzunlukta, 1,5 cm genişlikte ve 1 cm yüksekliğindedir. Ovaryumlar peritonun bir kıvrımı olan mesovarium ile broad ligament arka yüzeyine bağlanır. Ovaryum üst kutbu (tubal kutbu), ovaryum damarlarını ve sinirlerini taşıyan yumurtalığın suspensor ligamenti ile pelvik duvara bağlanır. Uterusa bağlanan alt (uterus kutbu) ise lig. ovaryum ile bu bağlantıyı gerçekleştirir. Bu bağ, yani gubernakulum, embriyonik filamentlerin kalıntılarından meydana gelir. Ergenlikten önce ovaryum yüzeyi pürüzsüzdür, ancak üreme sırasında tekrarlayan yumurtlama (ovulasyon) nedeniyle yavaş yavaş skar dokusu ile kaplanır ve düzensiz hale gelir. Azalan over rezervi nedeniyle menopoza sonrası kadınlarda, ovaryumlar üreme çağındaki kadınların ovaryumlarının 4'te 1'i kadar hacme gerilerler (19).

Overlerin çift arterden beslenirler. Hem uterin hem de ovaryan arterler overlere kan akışını sağlar. Ovaryan arter, renal arterin altında veya L2 civarında abdominal aorttan çıkan, sağlı ve sollu çift dal veren bir yapıdadır. Arter, overin suspensor ligamanından geçer ve daha sonra mezovaryuma girer(18).

Ovaryan venler, over ve tuba uterina yakınındaki broad ligamentte bulunan pleksustan kaynaklanır ve uterus pleksusuyla bağlantı kurarlar. Ardından m. psoas ve üreterin önüne doğru ilerlerler. Çoğu insanda sağ over veni inferior vena cava'ya ve sol over veni sol renal vene dökülür (20).

Overlerden tuba uterinalardan gelen lenfatikler, pelvik boşluğu üst kısımdan terk eder ovarian arterlere eşlik eden damarlar yoluyla doğrudan lateral aort veya lomber lenf nodlarına ve bazı varyasyonlarda da ön aortik lenf nodlarına drene olurlar (21).

Overlerden geçen bir kesit iki farklı bölgeyi ortaya sunmaktadır:

❖ Korteks veya kortikal bölge, en dış kısmı kapsayan bölgedir. Korteks, bağ dokuya gömülü over foliküllerini içerir. Foliküllerin etrafındaki yapıya stroma denir ve burada dağınık düz kas lifleri bulunmaktadır. Korteks medulla bölgesini kapsamaktadır.

❖ Medulla veya medüller bölge, overin orta kısmına verilen isimdir ve gevşek bağ dokusu, görece büyük kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler içerir. Medulla ve korteks arası sınırlar kesin olarak belirlenememektedir.

Ayrıca tunika albuginea adındaki yoğun bağ dokusu tabakası germinal epitel ile korteks arasında yer almaktadır (19).

Overlerin yüzeyleri tek katlı küboidal ve bazı kısımlarda skuamöz hücrelerce kaplıdır. Germinal epitel adı verilen hücre tabakası, mesovariumu kaplayan mezotel tabakası ile devamlılık göstermektedir. Germinal epitel terimi günümüzde geçmişten gelen bir yanlış adlandırma olarak kabul edilmektedir (19). Çünkü primordiyal germ hücreleri, insanlarda gebeliğin yedinci haftasında yolk kesesi endoderminden overlere göç eder ve oogonia adını alır. Bu oogonia hücre grubu burada mitozla çoğalmaya başlar. Bazı oogonialar birincil oositlere dönüşmeye başlar ve mayoz bölünmenin ilk aşamalarına yaklaşık 11-12. gebelik haftalarında girerler (22).

Oogenezin erken evreleri, oogonia sayısının mitoz bölünmeler ile arttırıldığı fetal yaşam sırasında başlar. Doğumda mevcut olan oositler, ilk mayoz bölünmede mayoz-I'in profaz evresinde duraklar(23). Ergenlik döneminde, küçük folikül grupları döngüsel büyüme ve olgunlaşmaya uğrar. Menarştan sonraki birkaç ay içinde düzenli ovulasyon siklusları meydana gelmektedir. Ancak zaman zaman hipotalamohipofizier aksın nispeten erken olgunlaşması ve LH'ye overlerin yanıtı arasında bir zaman farklılığı meydana gelebilir. Örneğin, vücut kitle indeksi (VKİ) çok yüksek veya çok düşük olan kızların daha geç menarş başlangıcına sahip olma olasılığı daha yüksektir. Bu durumun vücut kütlelerinin ve/veya vücut yağ oranının fizyolojik sınırlarda olmasının hipotalamohipofizier aksın olgunlaşmasına izin veren bir sinyal olduğu bilinmektedir (24). Normalde her adet döngüsünde bir oosit ovulasyon ile overden atılır. Bunun yanı sıra, ovulasyonda birden fazla oositin olgunlaşması ve atılması, birden fazla zigota yol açabilir. Üreme çağı boyunca, bir kadın sadece yaklaşık 400 olgun oosit üretir. Matematiksel modellerle yapılan çalışmalarda ovaryan rezervde ortalama menapozal yaşa sahip olan bir kadının 295000 primordial folikül rezervi olduğu ancak

dağılım aralığının oldukça geniş olduğu bulunmuştur; erken menapoza giren kadınların 35000 ve geç menapoza giren kadınlarda 2,5 milyonun üzerinde primordial foliküle sahip olması beklenmektedir (25) . Bu mevcut olduğu tahmin edilen ortalama 295000 primer oositin çoğu olgunlaşmayı tamamlayamaz ve atrezi, spontan hücre ölümü ve ardından olgunlaşmamış oositlerin rezorpsiyonu yoluyla kaybolur. Bu süreç, fetal yaşamın beşinci ayında başlar ve oositi çevreleyen hücrelerin apoptozisi bu eyleme arabuluculuk eder. Atrezi, yaşam boyunca primer oosit sayısını düşürür (26).

Overlerin birbiriyle ilişkili iki işlevi vardır: gametogenez (gamet üretimi) ve steroidogenez (steroid yapılı hormon üretimi). İki ana steroid hormon grubu – östrojenler ve progestojenler – overler tarafından üretilmektedir.

❖ Östrojenler, iç ve dış seks organlarının büyümesini ve olgunlaşmasını uyarır ve ergenlikte gelişen kadın cinsiyet özelliklerinden sorumlu olan hormonlardır. Ovaryumlarda özellikle estradiol (E2) en aktif östrojen formu olarak üretilir. Daha az aktif olan ve menapoz döneminde baskın östrojen hormonu olan estron (E1) adipoz dokuda adrenal dihidroepiandrosterondan (DHEA) üretilirken en az aktif form olan ve gebelikteki baskın östrojen hormonu olan estriol (E3), estrondan dönüştürülerek plasentadan sentezlenir. Teka hücrelerinden sentezlenen androjenler granüloza hücrelerine taşınır ve burada aromataz enzimleri ile estradiole dönüştürülür(27). Östrojenler reseptörü ER α aracılığı ile meme bezlerinde parakrin etkiler üzerinden özellikle duktal gelişimi sağlamaktadır(28).

❖ Progestojenler, endometriumdaki sekretuar değişikliklerin meydana gelmesinde rol oynayarak iç seks organlarını, özellikle de uterusu hamilelik için hazırlar. Progesterondaki artış endometriumda vaskülarizasyonda önemli bir artışa ve kan akışının artmasına neden olur(29). Progestojenler ayrıca meme bezlerinde östrojenle beraber bez duktuslarında gelişimi parakrin etkileri uyarak sağlar(30).

Dişi embriyolarda gonadal gelişim yavaş gelişmekte olan bir süreçtir. Kortikal kordlar, fetal dönemde gelişmekte olan overin yüzey epitelinin altta bulunan mezenşim dokuya doğru uzanır. Yüzey epiteli, peritonun mezotelinden meydana gelmektedir. Kortikal kordların boyutları büyüdükçe, yolk kesesinden göç etmiş olan ilkel germ hücreleri bu kordlara dahil olurlar. Yaklaşık 16.haftada kortikal kordlar, her biri bir oogonium içeren izole olmuş hücre kümelerine veya primordial foliküllere ayrılmaya başlar. Foliküller, yüzey epitelinin türetilen tek katlı yassı foliküler hücrelerinden oluşan bir tabaka ile çevrilidir.

Oogonia'nın aktif mitozu, fetal yaşam sırasında meydana gelir ve primordial foliküller üretir (31).

2.2 Folikül Gelişimi

Histolojik olarak, gelişimsel durum temelinde üç temel ovaryan folikül tipi tanımlanabilir:

- ❖ Primordial foliküller;
- ❖ Primer ve Sekonder foliküller olarak alt kategorilere ayrılan gelişmekte olan foliküller; ve
- ❖ Olgun foliküller veya Graaf folikülleri(32).

Ovaryan siklusta, gelişimin tüm aşamalarında foliküller bulunur, ancak primordial foliküllerin sayısı en fazladır.

2.2.1 Primordial Foliküller

Primordial foliküller ilk olarak fetal gelişimde ortaya çıkarlar. Primordial foliküller overlerde, korteksin stromasında bulunur. Tek bir skuamöz hücresi tabakası oositi çevreler. Folikül hücrelerinin dış yüzeyleri ise bazal lamina ile sınırlandırılmıştır (33).

Foliküldeki oosit yaklaşık 30 µm çapındadır. Oosit çekirdeği, ince dağılmış kromatin ve birden fazla nükleolus içeren bir yapıdadır ve ekzantirik yerleşim gösterir (19). Ooplazma olarak adlandırılan oositin sitoplazması balbiani cisimciği içermektedir. Ultrastrüktürel düzeyde, Balbiani cisimciği, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, sentrioller, çok sayıda mitokondri ve lizozomların lokalize birikimi olarak ortaya çıkar (34). Ek olarak, insan oositleri anuler lameller içerir ve çok sayıda küçük veziküller, küçük, küresel mitokondri ile sitoplazma boyunca dağılmışlardır. Anuler lameller nükleer zarf yapılarına benzerlik göstermektedir. Lamellerin her katmanında nükleer porlara benzeyen por yapıları bulunmaktadır(19).

2.2.2 Primer Foliküller

Primordial follikül gelişimlerinde oositte ve çevre dokuda birtakım gelişmeler meydana gelir. İlk olarak oosit boyutça büyümeye başlar ve bunu oositi çevreleyen yassı follikül hücrelerinin hacmi artarak kuboidal bir forma dönüşürler. Bu aşamada, yani folikül hücreleri küboidal hale geldiğinde, folikül primer (birincil) folikül olarak tanımlanır. Bu

aşamanın en önemli gelişmelerinden biri de FSH reseptör ekspresyonu ve oosit büyümesi ve farklılaşmasıdır (33). Folikül seçilimi ve büyümesinin ilk aşamaları gonadotropinlerden bağımsız olmasına rağmen, preantral aşamaya kadar birincil folikül gelişimi için FSH gerekliliği olduğu ileri sürülmüştür (35). Pre-antral foliküller FSH reseptörlerini eksprese edilse dahi FSH'ın pre-antral folikül büyümesinde zorunlu bir element olmasından ziyade büyümeye müsaade eden bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda hipogonadotropik hipogonadizimli kadınlarda overlerin histolojik incelemesinde çok katmanlı hücre topluluğuna sahip (granüloza ve teka) folikül gelişimi nadiren de olsa gözlemlenmiştir (36).

Oosit büyüdükçe, spesifik proteinler içeren ekstraselüler bir yapı olan zona pellucida ile kaplanmaya başlar. Zona pellucida, oosit ile komşu folikül hücreleri arasında ortaya çıkar.

Zona pellucida, ZP-, ZP-2 ve ZP-3 ve ZP-4 olarak adlandırılan dört farklı, sülfatlanmış asidik zona pellucida (ZP) glikoprotein sınıfından oluşur. Dördünden en önemlisi, spermatozoa bağlayıcı reseptör görevi gören ve akrozom reaksiyonunun indükleyicisi olan ZP-3'tür (37).

Foliküler hücreler bu evrede çoğalmaya devam eder ve artık granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Bu aşamada folikül henüz vasküler doku içermeyen, bazal membranla çevrili çok katmanlı bir primer folikül haline gelir(38). Foliküler büyüme sırasında granüloza hücreleri arasında oluklu bağlantılar (gap junction) oluşur. Bu bağlantıların yanı sıra granüloza hücreleri zona pellucidaya nüfuz eden ve oosit plazma membranı ile gap junction oluşturmak üzere sitoplazmik çıkıntılar geliştirir(39). Öte yandan, granüloza hücrelerinin bazal tabakası, kan-folikül bariyerine veya sıkı bağlantılara (zonulae occludentes) sahip değildir(40). Çünkü besinlerin ve küçük sinyal makromoleküllerinin kandan foliküler sıvıya hareketi, oosit ve folikülün normal gelişimi için gereklidir.

Granüloza hücreleri çoğaldıkça, folikülün etrafındaki stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında, teka folikülü olarak bilinen bağ dokusu hücrelerinden meydana gelen bir kılıf oluşturur.

Teka folikülü ayrıca teka interna ve teka eksterna olmak üzere ikiye ayrılır:

- ❖ Teka interna, salgı yapan kuboidal hücreleri içeren bir tabakadır. Teka interna'nın farklılaşmış hücreleri, steroid üreten hücrelerin karakteristik yapısal özelliklerine taşımaktadır. Teka interna hücreleri üzerlerinde çok sayıda luteinizan hormon (LH) reseptörü taşırlar. Teka interna hücreleri LH uyarısına

yanıt olarak östrojenlerin öncüleri olan androjenleri sentezler ve salgılarlar. Androgen sentezi yapan hücrelere ek olarak, teka internada kollajen fiberleri, fibroblastlar ve küçük damarların oluşturduğu ağlar bulunmaktadır(41).

- ❖ Teka eksternada ise düz kas hücreleri ve kollajen fiber demetleri bulunmaktadır.

Teka interna ve eksternanın histolojik kesitlerde ayrımını kesin olarak yapmak güçtür. Ancak, granüloza tabakası sahip olduğu bazal lamina ile teka hücrelerinden ayrılır. Ayrıca giderek vaskülarize olan teka tabakası avasküler olan granüloza tabakasından bu yolla da ayrılmaktadır(19).

2.2.3 Sekonder Foliküller

Primer folikül, çoğunlukla granüloza hücrelerinin proliferasyonu yoluyla, boyutu arttıkça başlangıçta kortikal stromaya daha derine iner. Follikül gelişimini sürdürürken granuloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar ortaya çıkar. Liquor folliculi adı verilen hyaluronan açısından zengin sıvı granüloza hücreleri arasında birikmeye devam ederken, küçük boşluklar yavaş yavaş birleşmeye başlar ve sonunda antrum adı verilen tek büyük bir boşluk oluşturur. Folikül artık sekonder folikül olarak tanımlanmaktadır(38).

2.2.4 Tersiyer (Olgun)(Graaf) Foliküller

Antrum geliştikçe, oositin etrafındaki granüloza hücreleri, antrum içine doğru bir çıkıntı şeklinde uzanan kümülüs oophorus adlı yapıyı meydana getirirler. Zona pellucida'yı çevreleyen ve sıkıca yapışmış olan granüloza hücreleri, korona radiatayı oluştururlar. Bu hücreler ovulasyonla beraber atılır ve oosite eşlik ederler (38) .

Graaf folikülünde antrum o kadar büyümüştür ki, oositi granüloza hücre tabakasına bağlayan bir sap gibi davranan kümülüs oophorus haricinde oositin etrafını tamamen sarmıştır. Ovulasyondan hemen önce, kümülüs oophorusdaki granüloza hücreleri dağılır. Korona radiata ve zonna pellucida ile kaplı oosit bu dağılan kümülüs hücreleriyle birlikte antral sıvıda serbestçe yüzer. Teka hücreleri ise tamamen farklılaşmış halde bulunurlar. İnsanlarda ovulasyondan hemen önce Graaf follikülleri 1cm'e kadar büyümüş yapılar olarak gözlemlenirler. Bu sebeple Graaf follikülü overin de çapını büyütür(42).

2.3 Ovulasyon

Primer oositin mayoz I'i tamamlamasına ve folikülün preovulatar matür veziküler aşamaya girmesine neden olan ani bir LH artışı menstrüasyon siklusunun ortasında meydana gelir. Bu sırada, over yüzeyinde şişkin ve avasküler bir tabaka olan stigma ortaya çıkar. Yüksek LH konsantrasyonu, kolajenaz aktivitesini artırır. Artan kolajenaz aktivitesi ile follikülü çevreleyen kolajen fiberleri sindirime uğrar. LH seviyeleri ile aynı zamanda progesteron seviyelerinde de bir artış meydana gelir. Bu artış ile folikül duvarında kasılmalar meydana gelmeye başlar. Oosit çevresindeki korona radiata hücreleriyle birlikte folikül duvarını yırtarak dışarı atılır(43).

Oositte meydana gelen mayoz bölünme, oositin primordial foliküller oluşturmak üzere granüloza hücreleri tarafından çevrelenmeden önce başlatılır ve hücre, profaz I'in diptoten aşamasında durdurulur. Kadınlarda cinsel olgunluğa erişildiğinde, primordial foliküllerin küçük bir kısmı aktive olur ve büyümeye başlar. Büyüyen oositlerdeki siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve granüloza hücrelerinde natriüretik peptit öncüsü tip C (NPPC)/natriüretik peptit reseptör 2 (NPR2) sistemi gibi moleküllerin, uzun süre boyunca oosit mayoz arrestinde önemli roller oynadığını gösterilmiştir. Daha sonra, gonadotropin uyarısına yanıt olarak tamamen büyümüş foliküllerdeki oositler, mayoz bölünmeyi sürdürür ve in vivo ovulasyon yeteneğine sahiptir(44).

Birinci mayoz bölünme tamamlanır tamamlanmaz, sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeye başlar. Sekonder oosit follikülü terk ederken, ikincil mayoz bölünme devam etmektedir ancak bu bölünme de metafazda durdurulur ve sadece sekonder oosit bir spermatozoon tarafından fertilize edilirse tamamlanır. Fertilizasyon meydana gelirse, ikincil oosit ikincil mayoz bölünmeyi tamamlar. Bu şekilde 23 kromozom içeren maternal pronükleusa sahip olgun bir oosit oluşur. Bu bölünmede üretilen diğer hücre ise ikinci polar cisimdir. İnsanlarda, ilk polar cisim ovulasyondan sonra 20 saatten fazla devam eder ve bölünmez; bu nedenle, fertilize olan oosit, iki kutup cisimciği (diploid birinci kutup cisimciği ve haploid ikinci kutup cisimciği) varlığı ile tanınabilir (45).

2.3.1 Corpus Luteum

Ovulasyondan sonra, geriye kalan granüloza ve tekal hücrelerden oluşan foliküler duvar, folikül çökerken derin kıvrımlar oluşturur ve korpus luteum veya luteal beze dönüşür. İlk başta, teka internadaki kılcal damarlardan foliküler lümene kanama, merkezi bir pıhtı ile

korpus hemorajikum oluşumuna yol açar. Stromadan gelen bağ dokusu daha sonra eski foliküler boşluğu istila eder. Granüloza ve teka interna tabakalarının hücreleri daha sonra luteinizasyon adı verilen süreçte granüloza luteal ve teka luteal hücrelere farklılaşır. Bu luteal hücreler, boyut olarak artan ve lipid damlacıkları ile dolan dramatik morfolojik değişikliklere uğrarlar (46). Hücrelerin sitoplazmasındaki yağda çözünen bir pigment olan lipokrom, taze preparatlarda onlara sarı bir görünüm verir(19).

Granüloza lutein hücreleri yaklaşık 30 μm çapındadır. Granüloza hücrelerinden türetilen korpus luteumun merkezinde yerleşen hücrelerdir. Korpus luteumun yaklaşık 4'te 5'ini oluştururlar ve östrojen, progesteron sentezlerler. Steroid salgılayan hücrelerin lipid damlacıkları birikimi, gelişmiş düz endoplazmik retikulum (SER) ve tübüler kristalli mitokondriler gibi tipik özelliklerini gösterirler(47) (19).

Teka lutein hücreleri daha küçüktür (yaklaşık 15 μm), daha koyu boyanır ve teka interna tabakasının hücrelerinden türemiş luteinize hücrelerdir ve periferik yerleşimlidirler. Korpus luteumdaki hücrelerin kalan 5'te 1'ini temsil ederler ve androjen ve progesteron salgılamakla görevlidirler(19).

Fertilizasyon ve implantasyon olmadığı durumlarda korpus luteum sadece 14 gün aktif kalabilmektedir. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) ve diğer luteotropinlerin yokluğunda, östrojen ve progesteronun salgılanma hızı azalır ve bunu takiben korpus luteum ovulasyondan yaklaşık 10 ila 12 gün sonra bozulmaya başlar. Korpus luteum hamilelik veya menstrüasyondan sonra dejenere olur ve yavaş bir involüsyona uğrar. Hücreler lipid ile yüklenir, boyutları küçülür ve otolize uğrar. Beyaz bir skar yapısı, korpus albicans, eski korpus luteumun dejenere olan hücreleri arasında hücreler arası hiyalin materyali biriktikçe oluşur. Korpus albicans, birkaç aylık bir süre içinde yavaşça kaybolarak over korteksinin daha derinlerine iner(48).

2.4 Atrezi

Embriyonik overde farklılaşmaya başlayan over foliküllerinin çok azı olgunlaşmasını tamamlayabilir. Foliküllerin çoğu, over foliküler atrezisi adı verilen bir süreçle dejenere olur ve kaybolur. Atreziye, granüloza hücrelerinin apoptozisi aracılık eder. Fetal gelişim, erken doğum sonrası yaşam ve ergenlik döneminde çok sayıda folikül atrezi geçirir. Ergenlikten sonra, her adet döngüsü sırasında folikül grupları olgunlaşmaya başlar; normalde sadece bir folikül (dominant follikül) olgunlaşmasını tamamlar (38).

İlginç bir şekilde, çoğu granüloza hücresi kaybolduktan sonra ve atrezi ilerledikçe oositte segmentasyon ve sitoplazmik vakuolizasyon dahil olmak üzere değişiklikler meydana gelir. Otofaji oosit atrezisinde önemli bir rol oynamaktadır (49).

Atrezide granüloza hücrelerinin ve oositin apoptosis ve otofaji ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan araştırmalarda apoptosisin, farelerde yapılan araştırmalarda ise otofajinin atrezide rol oynadığı gösterilmiştir. Bu durum, farklı canlı türlerinde atrezide farklı yolların aktive olduğunu göstermektedir (50).

2.5 Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu, üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin-metabolik bozukluğu temsil eden oldukça yaygın bir hastalıktır. Şu ana kadar PKOS'un dört belirlenmiş fenotipi vardır (51):

1. hiperandrojenizm+oligo-anovulasyon+polikistik over morfolojisi;
2. hiperandrojenizm+oligo-anovulasyon;
3. hiperandrojenizm+polikistik over morfolojisi;
4. oligo-anovulasyon+polikistik over morfolojisi.

Rotterdam kriterleri, PKOS için en yaygın olarak kabul edilen tanı kriterleridir ve oligo/anovulasyon, hiperandrojenizmin fiziksel veya biyokimyasal bulguları ve polikistik overler ile karakterize edilmiştir (52). Üç kriterden herhangi ikisinin pozitif olması, ayırıcı tanı yapılabilmesini, PKOS teşhisini ve bu teşhisle birlikte gelen tüm olası sonuçları verir. PKOS varlığı, infertilite, kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet ve jinekolojik maligniteler için daha yüksek bir risk oluşturur. Bu nedenle tanı koyulduktan sonra uygun tedavi modaliteleri belirlenir Yaşam tarzı değişikliklerinden tüp bebek tedavisine kadar her bir PKOS sekeli için çok sayıda farklı tedavi vardır.

2.5.1 PKOS Etiyolojisi ve Patofizyolojisi

PKOS etiyolojisi büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak günümüze kadar elde edilen kanıtlar, PKOS'un diyet ve yaşam tarzı faktörleri de dahil olmak üzere güçlü epigenetik ve çevresel etkilere sahip karmaşık bir multigenik bozukluk olabileceğini düşündürmektedir. PKOS sıklıkla abdominal yağlanma, insülin direnci, obezite, metabolik bozukluklar ve kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkilendirilmiştir (53).

PKOS, aşırı overyen ve/veya adrenal androjen sekresyonu ile karakterizedir. Bozulmuş steroidogenez gibi intrinsek over faktörleri ve hiperinsülinemi gibi over dışındaki faktörler aşırı overyen androjen üretimine katkıda bulunur. Karakteristik özelliklerinden biri, PKOS'lu kadınlarda fazla sayıda büyük inci dizisi morfolojisi gösteren teka interstisyel hiperplazi ile büyümüş overler klasik fazla androjen maruziyeti fenotipini yansıtır; bu morfoloji, konjenital adrenal hiperplazili (KAH) kadınlarda ve kadından erkeğe trans bireylerde de gözlenmiştir. Foliküler olgunlaşmadan sorumlu endokrin, parakrin ve otokrin faktörleri arasındaki çarpık etkileşimler, PKOS'ta over düzensizliğine katkıda bulunabilir (54).

2.5.1.1 Hiperinsülinemi

İnsülin, overyan teka hücrelerinde gelişmi ve androjen üretimini doğrudan tetikler. İnsülin, folikül membran hücrelerindeki reseptörlerini uyararak overyan folikül büyümesini ve hormon salgılanmasını etkili bir şekilde uyarır. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), luteinize edici hormon ile sinerji oluşturur. Hiperinsülinemi, LH bağlama bölgelerini ve androjen üreten LH'ye yanıtı artırır. LH ve insülin etkileşimi, steroidojenik akut düzenleyici enzimi (StAR) ve CYP450c17 mRNA ekspresyonunu artırır. CYP450c17 androjen üretiminde yer alır. Benzer şekilde insülin direnci, androstenedion ve testosteron üretiminde üretken enzim olan CYP17A1 aktivitesini artırır (55).

Öte yandan, hiperinsülinemi hepatik seks hormonu bağlayıcı globulini (SHBG) azaltır (56), azalan SHBG ile kandaki serbest testosteron seviyeleri artar, ayrıca artan LH sekresyonu da teka hücrelerinden androjen sentezini arttırmaktadır(57) . Ek olarak, hiperinsülinemi karaciğerde IGF-1 bağlayıcı protein üretimini inhibe eder. IGF-1, hücrelerde androjen üretimini tetiklemekten sorumludur. IGF-1 bağlayıcı proteinlerin üretiminin inhibisyonu, bu maddenin kan dolaşımında daha yüksek konsantrasyonuna ve ardından tekal hücrelerde daha yüksek androjen üretime yol açar(58). Ayrıca, IGF-1 upregülasyonu spesifik bir miRNA'yı azaltır ve böylece granüloza hücrelerinin apoptozunu hızlandırır ve folikülogenezi inhibe eder (59). Özetle, hiperandrojenizm ve hiperinsülinemi, folikül büyümesini durdurmada rol oynar. Folikül büyümesinin durması ile menstrüel düzensizliğe, anovulatuvar azalmış fertilitateye ve olgunlaşmamış foliküllerin birikmesine yol açar. Hiperinsülinemi aynı zamanda kilo alımı, lipolizin baskılaması ve adipositlerde lipogenezin artması ile de ilişkilidir (60).

2.5.1.2 Hiperandrogenizm

Hepatik hücrelerde gelişen hiperinsülinemide, insülin benzeri büyüme hormonu bağlayıcı protein (IGFBP1) üretimini downregüle eder ve böylece IGF-II seviyelerini upregüle edilir. Artan IGF-II, androjen seviyelerini artırarak folikülogenezi baskılar (61). Ayrıca hiperandrogenizm, dolaylı olarak LH'yi artırır. Estradiol ve progesteron, negatif feedback yoluyla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve LH salgılanmasının düzenlenmesinden sorumludur. Hiperandrogenizm, negatif feedback'i engelleyerek pulsatil salgılanan LH'nin salgılanma frekansının artmasına yol açar. Bu nedenle, GnRH nöronlarının GABAerjik (Gama amino bütirik asit) regülasyonundaki değişiklikler, PKOS'ta bozulmuş feedback ve GnRH/LH hipersekresyonuna yol açmaktadır. GnRH nöronlarında spontan GABAerjik tepkileri kaydeden çalışmalarda, dişi farelerde doğum öncesi androjen maruziyetinin, GnRH nöronlarında GABAerjik postsinaptik iletimin artmasına neden olduğunu birçok kez gösterilmiştir (62).

Tüm bu etkenlerin yanı sıra hiperandrogenizm, çizgili kaslarda insülin aracılıklı glikoz alım mekanizmalarını bozduğu ve hiperinsülinemiye yol açtığı ve ayrıca adipoz dokuda artmış inflamasyon, pankreasta β hücre disfonksiyonu, karaciğerde yağ birikimi gibi sorunlara da neden olduğu keşfedilmiştir (63).

2.5.1.3 Obezite

Obezite, düşük dereceli kronik inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Adipositlerin visceral yağda birikmesi, hipoksiye ve bunun sonucunda inflamatuvar sitokin üretimine neden olan nekroza yol açar. Yağ dokusunun mononükleer hücreleri, proinflamatuvar sitokinler üretir. Aşırı visceral yağ da inflamatuvar durumdan sorumludur. Obezite ayrıca hiperinsülinemi, insülin direnci ve hiperandrogenizm oluşumunda rol oynar. Visceral obezite, kandaki esterleşmemiş yağ asitleri seviyelerinde bir artışa neden olur. İskelet kasları, enerji kaynağı olarak glikoz yerine bu yağ asitlerini kullanır. Bu durum sonrası açığa çıkan hiperglisemi pankreasta hızlı reaksiyona ve hiperinsülinemiye yol açar (64). Ek olarak, visceral yağın katekolaminlere lipolitik yanıtı, lipotoksositeye ve insülin klirensi ve aktivitesinin bozulmasına neden olur. Serbest yağ asitleri (FFA), IRS-1 serin/treonin fosforilasyonunu uyarır ve tirozin fosforilasyonunu azaltır. Artan serbest yağ asitleri, insülin ve glukoz alım duyarlılığını azaltır. Yağ dokusu bahsedilen bu tüm işlevlere ek olarak, endokrin işleve sahiptir ve adipokin veya adipositokin adı verilen kimyasalları salgılar. Bu adipokinlerden biri olan

leptinin düzeylerinin yüksek oluşunun folikülogenez matürasyonu eksikliği ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (65).

Bütün bu olumsuz etkilerin yanı sıra adipositler tarafından salgılanan bir diğer adipokin olan adiponektinin insülin duyarlılaştırıcı, anti-diyabetik ve anti-inflamatuar etkileri vardır. Adiponektin insülin duyarlılaştırıcı etkisi, serbest yağ asitleri alımında ve glukoneogenezde azalmaya neden olur (66). Ayrıca progesteron ve östrojen sentezini artırır (67). GnRH ve LH salınımı ve androstenodion sentezini azaltır(68). Ancak visseral adipositlerin adiponektin salgılama kapasitesi subkutanöz adipostlere kıyasla oldukça azdır. Bu yüzden visseral obezitede adiponektin seviyeleri düşüktür (69).

2.5.2 Tedavi

2.5.2 .1 Diyet ve Fiziksel Aktivite

PKOS teşhisi konan kadınlar için ilk adım kilo vermek ve kalori alımını kısıtlamak olacaktır. Obez kadınlar için normal vücut kitle indeksi (VKİ) aralığına ulaşmaları en iyisidir. Diyetle sağlanan kilo kaybı ile serbest testosteron seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.(70).

Egzersiz ve fiziksel aktivite kilo vermede önemli bir rol oynar. İnsülin duyarlılığını iyileştirmek için faydalı olabilirler. Egzersizin hipotalamo pitiüer gonadal (HPG) aksın modülasyonu yoluyla ovulasyonu etkilediği düşünülmektedir. Aşırı kilolu ve obez kadınlarda egzersiz, insülin ve serbest androjen düzeylerinin düşmesine yol açarak, hipotalamo pitiüer adrenal aks (HPA) yoluya ovulasyon düzene girmesini sağlar (71).

2.5.2.2 Farmakolojik Tedavi

Hormonal kontraseptifler, menstrual siklus düzensizlikleri ve PKOS'ta hirsutizm/akne için birinci basamak tedavidir. Kломifen infertilite için birinci basamak tedavidir; metformin, metabolik/glisemik anormallikler ve menstrual düzensizliklerinin iyileştirilmesi için faydalıdır, ancak hirsutizm, akne veya infertilite tedavisinde sınırlıdır veya fayda göstermemiştir. PKOS'lu adolesanlarda hormonal kontraseptifler ve metformin tedavi seçenekleridir (72).

2.6 Yes-Associated Protein 1 (YAP1) ve PKOS İlişkisi

Hippo sinyal yolağı doku proliferasyonunu kontrol eden ve “organ boyutu” kontrol noktasında kritik bir işlev gören bir yoldur. Bu yolak ilk olarak *Drosophila*'da keşfedilmiştir ve memelilerde de benzer olarak işlev gördüğü bulunmuştur. Hippo yolağı bileşenlerindeki mutasyonlar, meme, over ve karaciğer dahil olmak üzere çok sayıda kanserle bağlantılıdır (73).

Hippo kinazlar ve adaptör proteinler, yes associated protein'in (YAP) ve onunla yakından ilişkili transkripsiyonel koaktivatör olan TAZ'ın (PDZ bağlanma motifli transkripsiyonel koaktivatör) fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna aracılık eder. YAP/TAZ'ın yaygın aktivasyonu ve ekspresyonu birçok insan tümöründe gözlemlenmiştir. YAP1, tümörlerin anti kanser tedavilere karşı direnç, uzak yayılım gibi malign özellikler kazanması ile yakından ilişkilidir (74). YAP'ın overekspresyonu veya nükleer lokalizasyonu, akciğer, kolorektal, over ve karaciğer kanserleri gibi çeşitli kanserlerle ilişkili bulunmuştur (75)(76).

YAP1 insanlarda 48 ve 54 kDa ağırlığında iki transkript varyasyonu bulunan (77), prolinden zengin bir fosfoproteindir ve Hippo yolunun transkripsiyonel koaktivatörü olarak görev yapar (78). Hücre nükleusuna da geçebilen YAP, burada TEAD1/4'e bağlanır. YAP/TEAD bağlantısı hücre büyümesini teşvik etmek ve apoptozu inhibe etmek için gerekli genlerin transkripsiyonunu aktive eder (73). Yapılan vaka kontrol çalışmalarının bazıları YAP'ın meme kanserlerinde antitümör özellik gösterdiğini (79) bir diğer grup çalışma ise meme kanserinde prognozu kötüleştirdiğini göstermiştir(80).

YAP1, PKOS'un en önemli sonuçlarından biri olan overlerin aşırı büyümesi de dahil olmak üzere organik morfolojiyi düzenleyen birçok sinyal yolağında yer alır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), YAP1'in tek nükleotid polimorfizmlerinin (rs11225161, rs11225138 ve rs11225166) PKOS ve kontroller arasında önemli ölçüde farklı olduğunu ve bunun PKOS için yeni bir duyarlılık geni olabilme potansiyelini göstermiştir (81).

Bir başka yapılan çalışmada oluşturulan fare deney modelinde YAP1'in over granüloza hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğunu, ancak ekstrasellüler regüle kinaz-1/2 (ERK1/2) kaskadı yoluyla LH tarafından down regüle edildiğine dair yeni kanıtlar sunulmuştur. Akut hiperandrojenizm, LH aktivitesini bloke eder ve YAP1'i aktive ederek oligo-ovülasyona neden olur (82).

Granüloza hücreleri üzerinden yapılan bir başka analizde ise YAP1 mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin, PKOS hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada YAP1 promoter geninin hipometilasyonunun da ayrıca PKOS gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir (83).

2.7 Verteporfin

Bir benzoporfirin türevi monoasit halka A olan Verteporfin, 689nm dalga boyunda düşük yoğunluklu, ısı üretmeyen ışıkla aktive edilen, bulunduğu dokuyu fotodinamik terapi (PDT) için ışığa duyarlı hale getiren bir ilaçtır (84).

Verteporfin, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, patolojik miyopi ve oküler histoplazmozun neden olduğu neovaskülarizasyonu tedavi etmek için FDA tarafından onaylanmıştır (85).

Liu-Chittenden ve ark yaptığı çalışmada verteporfin, TEAD-YAP bağlantısını bozan ve YAP1 ile indüklenen karaciğer aşırı büyümesini engelleyen küçük bir molekül olarak tanımlanmıştır. Bu bulgular, verteporfinin TEAD-YAP etkileşimlerinin engellenmesi amacıyla farmakolojik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (86).

Verteporfin, YAP-TEAD etkileşimini bozmasının yanı sıra YAP'ı sitoplazmada tutulmasını sağlayan ve proteozomda bozunmayı hedefleyen bir YAP şaperon proteini olan 14-3-3σ'nun seviyesini artırarak YAP'ın sitoplazmada sekestrasyonunu indükler (87).

Glioblastoma hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise verteporfinin YAP-TEAD etkileşimini bozma yeteneğinden faydalanılarak glioblastomalar için aday bir terapötik ajan olduğu gösterilmiştir(88).

YAP overekspresyonu kolorektal kanserlerde anti neoplastik ilaç olan taxolün direncine neden olan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. YAP overekspresyonunu gösteren LoVo kolorektal kanser hücre hatlarının verteporfin ile inhibisyonu sonucunda YAP seviyelerinin azaldığı ve dolayısıyla taxol direncinin de azaldığı gösterilmiştir (89).

Ayrıca verteporfin, ovaryan kanserde fotodinamik tedavi için nanopartikül lipid taşıyıcılar (NLC) içinde kapsüllenmiştir ve hem in vivo hem in vitro deney modellerinde ovaryan kanserlerde fotodinamik terapinin etkinliğini arttırmıştır (90). A2780C hücre hattı olarak bilinen, cisplatine dirençli ovaryan kanser hücre hatlarında ise bu hücre hatlarına verteporfin verilmesi bu kanser hücrelerinin proliferasyonunu yavaşlatmış ve bu çalışmada ayrıca verteporfinin A2780C hücre hattında kemoterapi direncini azalttığı öne sürülmüştür (91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları ünitesinden yaklaşık olarak 10 haftalık, ortalama ağırlığı 180-200 gram olan, daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış 30 adet dişi rattus *norvegicus* cinsi Wistar albino soyu sıçan kullanıldı. Çalışmamızın onayı Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan (HADYEK) 64583101/2020/127 sayılı etik kurul onayı ile alınmıştır. Deney süresince sıçanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsüne sahip, bağıl nem oranı %40-%60 ve ortam ısısı 22°C olan düzenekli bir ortamda muhafaza edildi. Sıçanların deney süresince su ve yem ihtiyaçları ad libitum olarak karşılanıp kafesler 2 günde bir olacak şekilde temizlenmiştir.

3.2 Deney Gruplarının Planlanması

Sıçanlar temin edildikten sonra rastgele üç ayrı gruba (n=10) ayrıldı:

Grup I: (Kontrol Grubu) Deney süresince her gün gavaj yoluyla sadece vehicle 1ml %0,5 karboksimetil selüloz (CMC) uygulanacak olan kontrol grubu.

Grup II: (PKOS Grubu) Deney süresince her gün gavaj yoluyla perioral olarak 1ml %0,5 içinde 1 mg/kg dozunda letrozol uygulanacak olan grup.

Grup III: (Verteporfin Grubu) Deney süresince her gün gavaj yoluyla perioral olarak 1ml %0,5 CMC içinde 1 mg/kg dozunda letrozol uygulanıp, 3 günde bir intraperitoneal olarak %1'lik DMSO içinde çözülmüş olan 2mg/kg Verteporfin enjeksiyonu yapılacak olan grup.

3.3 Letrozol Uygulanması

Grup II ve Grup III'teki sıçanlara letrozol 1ml'lik %0,5 CMC içinde suspanse edilerek oral yoldan verilmiştir. 1Ml distile suda CMC çözülerek %0,5'lik solüsyon hazırlanmıştır. Ardından ince toz haline getirilen letrozol kristalleri bu solüsyona eklenerek bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu şekilde 1mg/kg letrozol dozu hazırlanmıştır (92).

3.4 Verteporfin Uygulanması

Grup III'teki sıçanlara verteporfin %1'lik DMSO içinde çözündürülerek intraperitoneal yoldan dozu 2mg/kg olacak şekilde enjekte edilmiştir. Verteporfin önce saf

DMSO da çözdürülmüş, ardından bu çözeltiye steril fosfat tamponlu salin (PBS) eklenerek 1ml'de %1 DMSO'da çözünmüş 2mg/kg verteporfin olacak şekilde dilue edilmiştir. Verteporfin dozu daha önce yapılan in vivo çalışmalardan yola çıkılarak insan terapötik dozuna yakın bir doz olarak belirlenmiştir (16). Verteporfin 3. günden başlayarak 3 günde bir olmak üzere deney sonuna kadar intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

3.5 Vücut Ağırlığı Tartımı

Deney hayvanları teslim alındıkları günden itibaren haftada bir tartılarak vücut ağırlıkları kaydedilmiştir.

3.6 Deneyin Sonlandırılması

21. günün sonunda sıçanlardan ketamin/ksilazin anestezi altında önce intrakardiyak 3ml kan alınmış, ardından sıçanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. PKOS grubundan bir sıçanın gavaj komplikasyonlarından ötürü deney tamamlanamadan ölmesi sonucu 29 hayvan sakrifiye edilmiştir. Ovaryum dokuları disseke edilerek çıkarılmış ve ağırlık tartımı işlemi ardından %10'luk nötral tamponlu formalinle (NBF) tespit edilmiştir.

3.7 Doku Takibi

Ovaryumlar histokimyasal boyama ve immünohistokimya çalışmaları için histolojik takip işlemine alınmıştır. Takip sürecinde dokular fiksasyonun ardından akarsu altında bir gece yıkamaya bırakılarak fiksasyon maddesinden uzaklaştırılmaları sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra cihaz kullanmadan elle yaptığımız takip Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I: Doku takip protokolü

Kimyasallar	Süre
%70'lik alkol	1 saat
%80'lik alkol	1 saat
%96'lik alkol	1 saat
>%99,5'lük alkol	1 saat
Ksilol (etüvde 60°C)	45 dakika
Ksilol (etüvde 60°C)	45 dakika
Parafin (etüvde 60°C)	1 saat
Parafin (etüvde 60°C)	1 saat
Blok gömme	

Her gruptan sağ overler seçilerek optimal kesim aralığında horizontal olarak 4 µm kalınlığında kesitler alınarak lamlara aktarılmıştır. Yalnızca kontrolde 2 ve tedavide 1 doku bloğundaki takip sonrası doku hasarından ötürü sol ovaryumlar kesitlere dahil edilmiştir. Kesitlerin alınmasının ardından hematoksilen-eozin, masson trikrom ve immunohistokimya boyama işlemlerine geçilmiştir. Alınan kesitler numaralandırılmış ve her dokudan 30. ve 40. kesitler arası 10 kesit alınarak bu kesitlerde histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar yapılmıştır.

3.8 Histokimyasal Boyamalar

Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması için doku slaytları etüvde 3 saat boyunca 60°C'de bekletilmiştir

Hematoksilen-Eozin protokülü Tablo II'de gösterilmiştir

Tablo II: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk
>%99,5'luk alkol	1 dk
%80'lik alkol	1 dk
Distile su	5 dk
Harris's hematoksilen	1 dk
Akarsu altında yıkama	1 dk
Eozin	1 dk
%80'lik alkol	1 dk
>%99,5'luk alkol	1 dk
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk
Entellan ile kapama	

Masson Trikrom boyaması için doku slaytları etüvde 3 saat boyunca 60°C'de bekletilmiştir. Masson Trikrom protokolü Tablo III'te gösterilmiştir.

Tablo III: Masson Trikrom boyama protokolü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk
>%99,5'luk alkol	1 dk
%80'lik alkol	1 dk
Distile su	5 dk
Weigert'in demirli hematoksileni	10 dk
Distile Suda Yıkama	
Alkolik Bouin Solüsyonu	5 dk
Distile Suda Yıkama	
Biebrich scarlet-asid fuksin solüsyonu	15 dk
Distile Suda Yıkama	
Fosfomolibdik Asit	5 dk
Anilin Blue Solüsyonu	10-12 dk
Distile Suda Yıkama	
%80'lik alkol	1 dk
>%99,5'luk alkol	1 dk
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk
Entellan ile kapama	

3.9 İmmünohistokimya protokolü

YAP1 ve TEAD antikorlarıyla yapılacak immunohistokimyasal boyama kesitler polilizinli lamlara alındı. Slaytlar 45°C'ye ayarlanan etüvde 1 gece bırakıldı. Ertesi gün etüvün ısısı kesit slaytlarından parafini uzaklaştırmak amacıyla 60°C'ye çıkartılarak, slaytlar 2 saat daha etüvde bekletildi. Ardından Tablo IVa ve Tablo IVb'de gösterilen protokol ile immunohistokimya boyaması yapılmıştır.

Tablo IV: Preparatların immunhistokimyasal boyama protokolü

Tablo IVa: Overnight öncesi

Kullanılan materyal	Süre
Ksilol	30 dk
>%99,5 alkol	2 dk
%96	2 dk
%80	2 dk
%70	2 dk
Distile su	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Tripsin+EDTA (Etilendiaminetetraasetik asit)	37 °C etüvde 30 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Hidrojen peroksit + metanol	30 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Solüsyon A (Blocking Solüsyonu)	1 saat
Primer antikor	
Over-night	20 saat

Tablo IVb: Overnight sonrası

Kullanılan materyal	Süre
PBS	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Solüsyon B (Sekonder Antikor)	90 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Solüsyon C (Streptavidin Peroksidaz)	30 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
DAB solüsyonu	45sn-1 dk
Distile su	1 dk
Mayer's hematoksilen	10 dk
Akarsuda bekletme	10 dk
>%99,5 alkol	30 sn
%96	30 sn
%80	30 sn
Ksilol	10 dk
Entellan ile kapama	

3.10 Hormon Analizleri

Deneyin sonlandırıldığı gün alınan kan örnekleri sarı kapaklı biyokimya tüplerine konulmuş ve hormon analizleri (Testosteron, Östrojen, FSH ve LH) için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır. FSH ve LH örneklerinde analizin gerçekleşmemesi sonucu sıçan LH ve FSH hormonu ELISA kitleri ile FSH ve LH analizleri tekrarlanmıştır.

3.11 İstatistiksel Analizler

Araştırma verileri IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 26.0 istatistik programına girilerek, analiz edilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan verilerde ortalama ve standart sapma değerleri, normal dağılıma uymayan verilerde ise ortanca, minimum ve maksimum değerleri kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan verilerin karşılaştırılmasında One-Way ANOVA ve Student's t-test testleri, normal dağılıma uymayan verilerin karşılaştırılmasında ise non-parametrik Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Kategorik verilerde ise ki-kare testi ile analiz yapılmıştır.

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmesi için, p değerinin 0,05'ten küçük ($p < 0.05$) olması koşulu aranmıştır.

3.11.1 Vücut Ağırlıkları ve Over Ağırlıkları Analizleri

Vücut ağırlıkları hayvanlar temin edilirken hemen tartılmış ve kaydedilmiştir. Ardından haftada bir vücut ağırlığı tartımı yapılmıştır.

Elde edilen ovaryumlar sağ ve sol ovaryum olarak ayrılıp ağırlıkların gruplar arasındaki farklılığı analiz edilmiştir.

Tüm ağırlık verilerinde One-Way ANOVA ve Student's t-test kullanılmıştır.

3.11.2 Histokimyasal Analizler

Hematoksilen & Eozin boyamada dokularda semikantitatif bir skorelama ile değerlendirilme yapılarak kist yoğunluğu, granüloza hücrelerinde azalma/dejenerasyon, teka hiperplazisi ve korpus luteum varlığı skorlanmıştır.

H&E Boyamaları İçin Skorelama:

Kistler için:

- 0: Kist yok
- 1: Kistler belli bir bölgede yoğun
- 2: Kistler tüm dokuda yaygın olarak bulunmakta

Granüloza Dejenerasyonu İçin:

- 0: Dejenerasyon yok
- 1: Kistin belli bölgesinde dejenerasyon bulunmakta.
- 2: Tüm kistlerde yoğun granüloza dejenerasyonu bulunmakta.

Teka Hiperplazisi İçin:

- 0: Hiperplazi yok
- 1: Yer yer kısmi hiperplazi bölgeleri mevcut
- 2: Tüm kistlerde yoğun teka hiperplazisi bulunmakta.

Korpus Luteum İçin:

- 0: Korpus Luteum yok
- 1: Bir adet korpus luteum var
- 2: Birden fazla korpus luteum mevcut

Elde edilen sonuçlar kategorik olarak belirlenmiş ve ki-kare testi ile analiz edilmiştir.

Masson-Trikrom boyamada dokularda semikantitatif bir skorlama ile değerlendirilme yapılarak teka hiperplazisi ve medulla boyanması skorlanmıştır

Masson-Trikrom Boyamaları İçin Skorlama:

Teka Hiperplazisi İçin:

- 0: Hiperplazi yok
- 1: Yer yer kısmi hiperplazi bölgeleri mevcut
- 2: Tüm kistlerde yoğun teka hiperplazisi bulunmakta.

Medulla Boyanması İçin:

- 0: Boyanma Yok
- 1: Az Boyanma
- 2:Orta Boyanma
- 3: Şiddetli Boyanma

Şeklinde kategorilerle ayrılarak skorlama yapılmış ve bu sonuçlara göre veriler ki-kare testi ile analiz edilmiştir.

3.11.3 İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal boyamalarda her bir denekten seçilen preparattan folikül yapılarından x40lık büyütme ile rastgele seçilen 10 alanda bulunan granüloza, teka hücrelerinden ve kist duvarlarındaki hücrelerden hücre çekirdekleri pozitif boyananlar sayılmıştır. Bu sayım ile elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılığını belirlemek için SPSS 26 programı ile One Way ANOVA ve Student's T Test testleri yapılmıştır.

3.11.4 Biyokimyasal Analizler

Her grupta kan serumundan ölçülen testosteron, östrojen, FSH sonuçları One-Way ANOVA ve Student's t-test testleri, LH sonuçları ise Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile analiz edilmiştir.

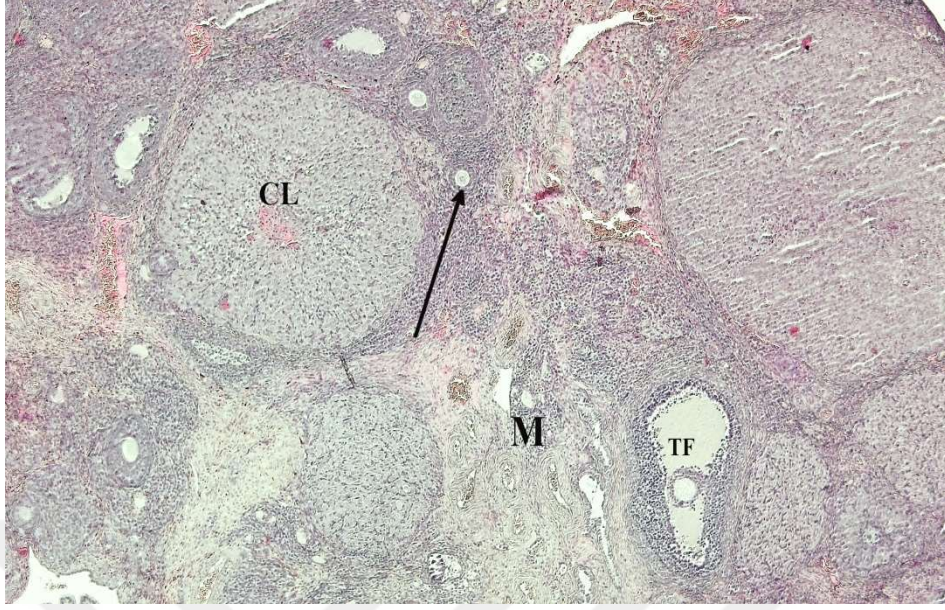
4.BULGULAR

4.1 Histokimyasal Bulgular

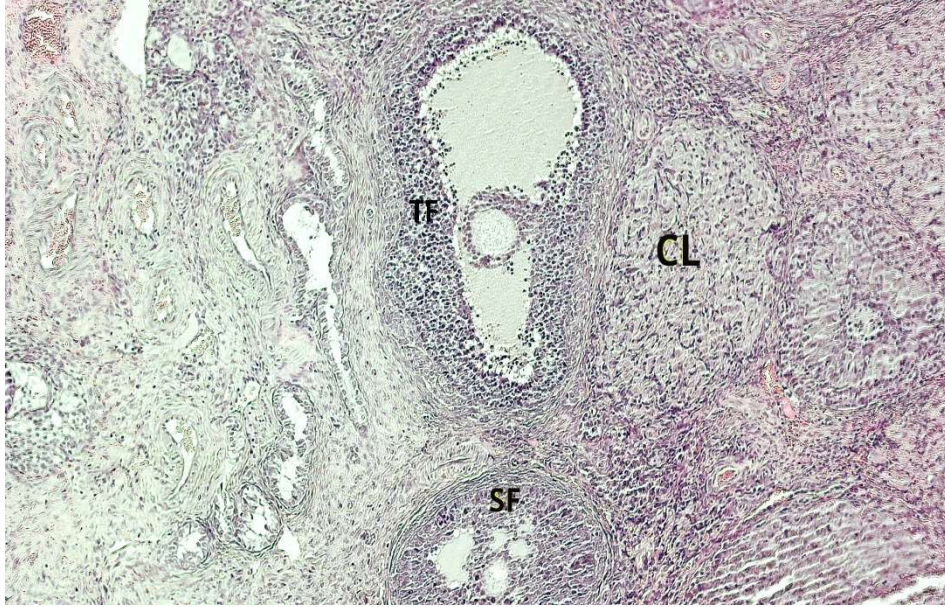
H&E boyamalarında gruplar arasında kistler, granüloza dejenerasyonu ve teka hücreleri hiperlazisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlam bulunamamıştır. Hem PKOS hem de Verteporfin grubunda yoğun sayıda kist gözlemlenmiştir. Ancak her denekten alınan 30.,35. ve 40. Kesit slaytlarından yapılan kist sayımında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. PKOS grubundaki deneklerin büyük kısmında korpus luteum gözlenememiştir. Masson-Trikrom boyamalarında ise PKOS grubunda istatistiksel olarak anlamlı artmış teka eksterna ve medulla boyamaları gözlemlenmiştir.

Tablo V: 3 preparattan sayılan kist sayılarının gruplara göre ortalamaları ve standart sapmaları

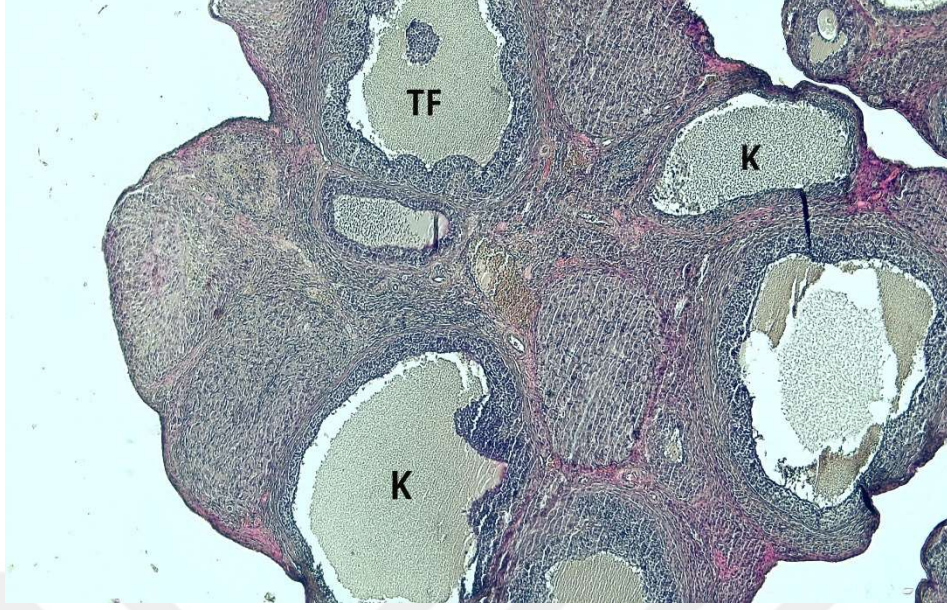
Gruplar	Kist Sayıları Ortalama +std
PKOS	17 ± 1,26
Verteporfin	16,10 ± 0,73



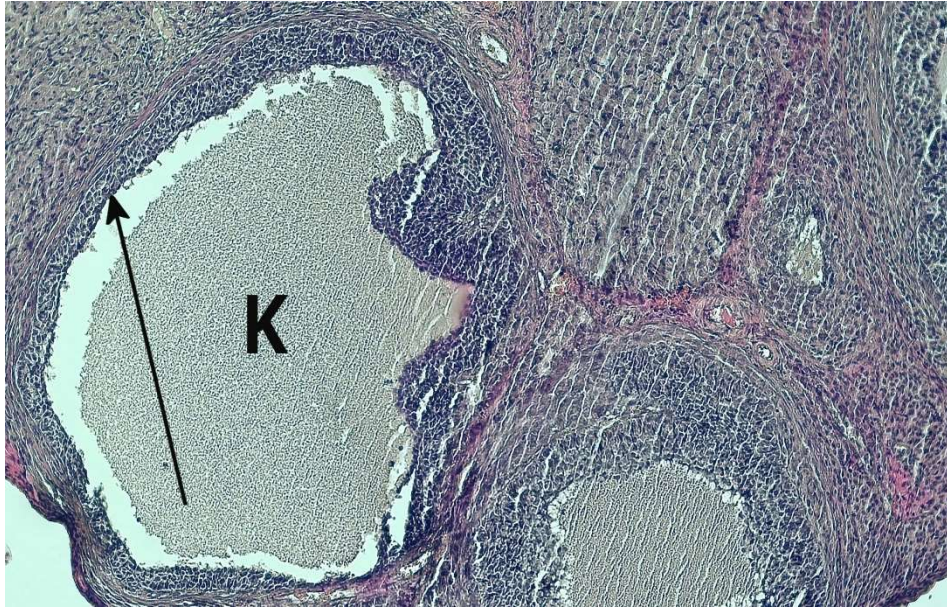
Resim 1: Kontrol grubu over dokusu H & E boyaması, primer ve tersiyer follikül ve medulla gözlemlenmektedir. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) (CL:Corpus Luteum, , TF:Tersiyer Folikül, M:Medulla, Ok: Primer Follikül)



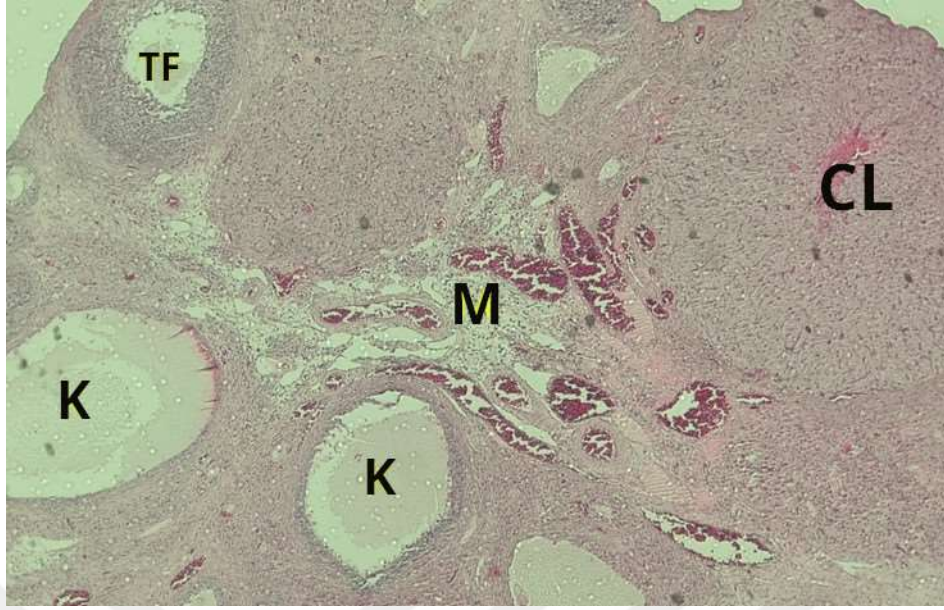
Resim 2: Kontrol grubu over dokusu H&E boyaması. Merkezde tersiyer bir folikül ve bu folikülün sağ yanında bir corpus luteum, ve tersiyer follikülün altında bir sekonder follikül yapısı görülmektedir. (TF:Tersiyer folikül, SF: Sekonder Folikül, CL:Corpus Luteum) (Fotomikrograf x10 büyütme ile görüntülenmiştir.)



Resim 3: PKOS grubu over dokusu H & E boyaması. Over dokusu yoğun miktarda kistik yapı içermektedir. Aynı zamanda üst bölgede bir tersiyer follikül gözlemlenmektedir. Kistler içi follikül sıvısı dolu hacimce büyük yapılar olarak izlenmektedir. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) (K:Kist, TF:Tersiyer Folikül)



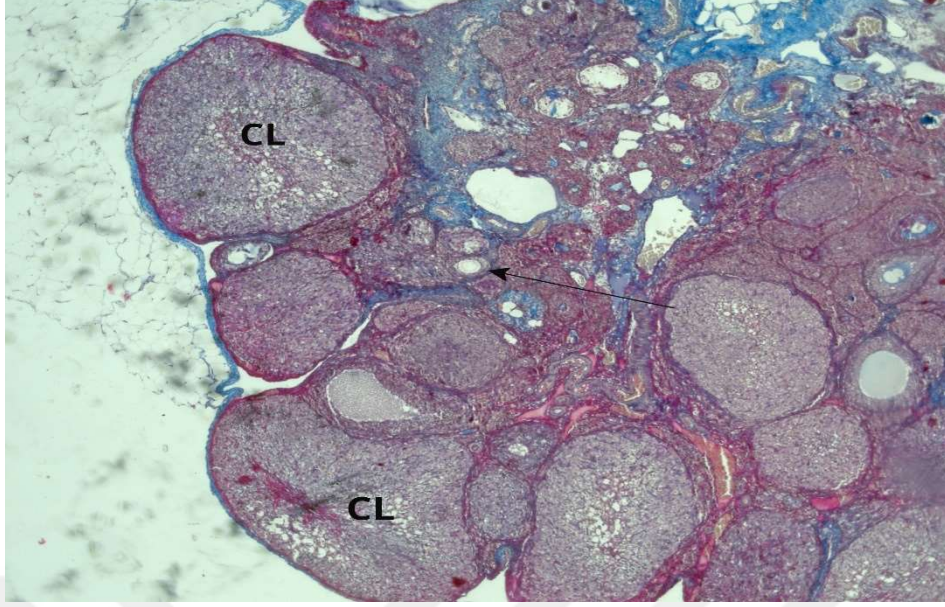
Resim 4: PKOS grubu over dokusu H & E boyaması. Kist duvarında bulunan granüloza hücrelerinde sayıca azalma ve dejenerasyon mevcuttur. Granüloza hücreleri okla gösterilmiştir. K: Kist (Fotomikrograf x10 büyütme ile görüntülenmiştir.)



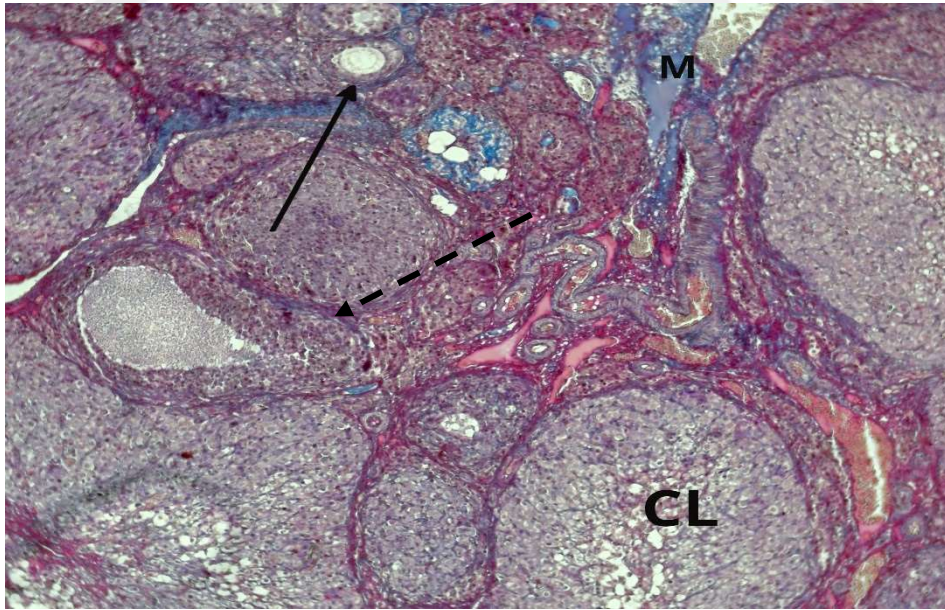
Resim 5: Verteporfin grubu over dokusu H & E boyaması. Yoğun miktarda kistik yapı içermektedir. Kistler içi follikül sıvısı dolu hacimce büyük yapılar olarak izlenmektedir. Ayrıca bir adet tersiyer follikül, korpus luteum ve overin medulla bölgesi de gözlemlenmektedir. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) (K:Kist, TF:Tersiyer Folikül, M: Medulla)



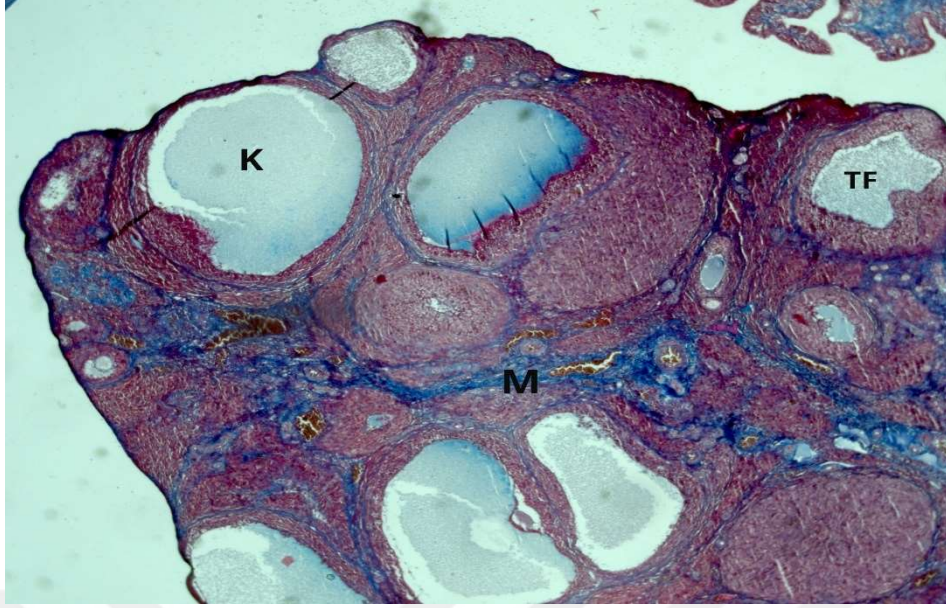
Resim 6: Verteporfin grubu over dokusu H & E boyaması. Kist yapıları gösterilmiştir. Granüloza hücrelerinde sayıca azalma ve dejenerasyon mevcuttur. Granüloza hücreleri okla gösterilmiştir. (Fotomikrograf x10 büyütme ile görüntülenmiştir.) (K:Kist)



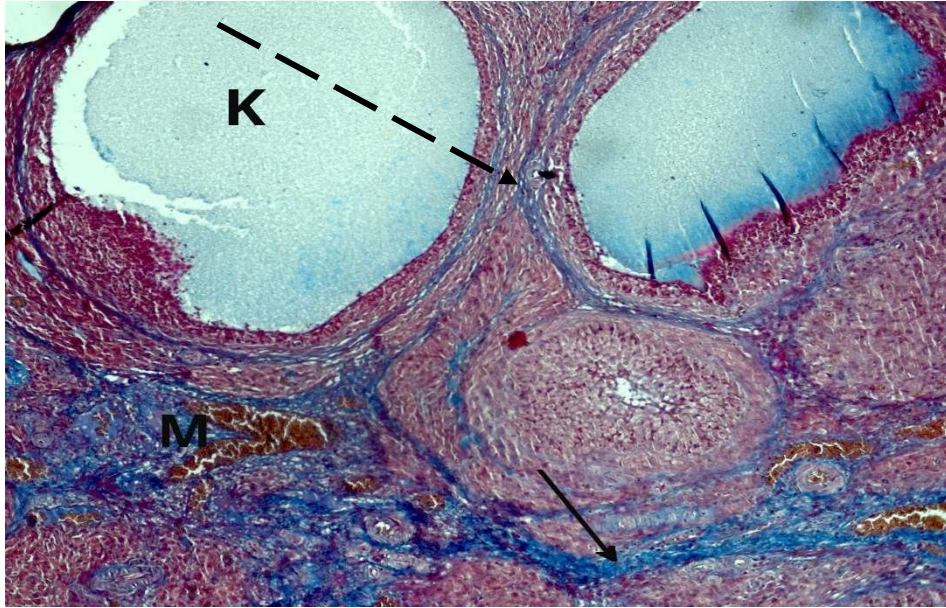
Resim 7: Kontrol grubu over dokusu MT boyaması. Birden fazla korpus lutem ve bir adet primer follikül gözlemlenmektedir. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) (CL:Corpus Luteum, PF:Primer Folikül)



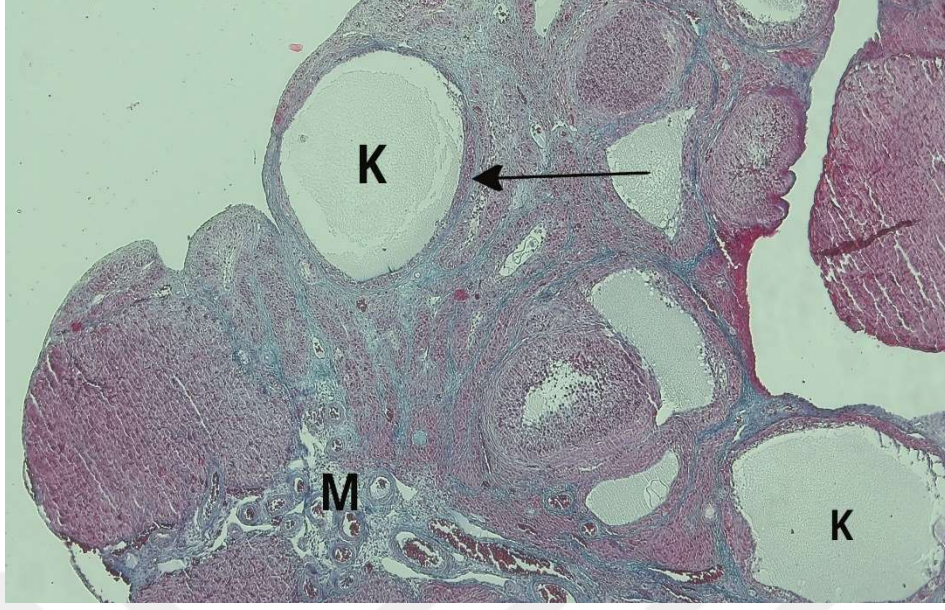
Resim 8: Kontrol grubu over dokusu MT boyaması. Bir adet tersiyer follikül, primer follikül ve korpus lutem görülmektedir. Bağ dokusu ve kan damarları içeren medulla bölgesi anilin blue ile hafif boyanma göstermiştir. (Fotomikrograf x10 büyütme ile görüntülenmiştir.) (CL:Corpus Luteum, M:Medulla, Primer follikül okla gösterilmiştir, kesikli ok teka ekstarna tabakasını göstermektedir.)



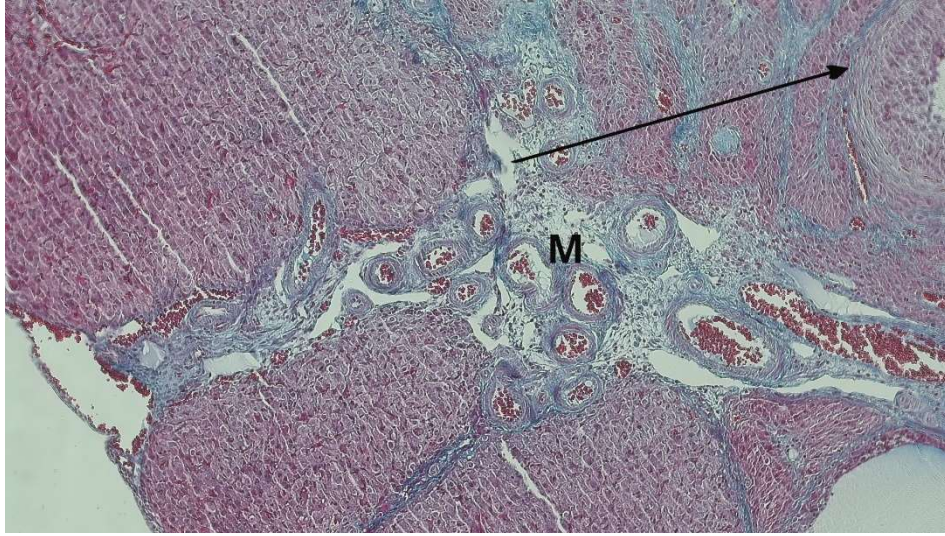
Resim 9: PKOS grubu over dokusu MT boyaması. Çok sayıda kistik yapının yanı sıra medullada boyanma artışı da gözlenmektedir. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) (**K**:Kist, , **TF**:Tersiyer Folikül, **M**:Medulla)



Resim 10: PKOS grubu over dokusu MT boyaması. Yoğun kistik yapıların yanı sıra medullada boyama artışı da **okla** gösterilmiştir. **Kesikli ok** teka ekstarna tabakasını göstermektedir. Kistlerde teka tabakalarında hiperplazi mevcuttur (Fotomikrograf x10 büyütme ile görüntülenmiştir.) (**K**:Kist, , **M**:Medulla)



Resim 11: Verteporfin grubu over dokusu MT boyaması. Kistik yapılar mevcuttur ancak medulla boyanması PKOS grubu kadar yoğun izlenmemektedir. Teka eksterna okla gösterilmiştir. Teka hiperplazisi kistlerde mevcut gözükmemektedir. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) (**K**:Kist, **M**:Medulla)



Resim 12: Verteporfin grubu over dokusu MT boyaması. Kistik yapılar mevcuttur ancak medulla boyanması PKOS grubu kadar yoğun izlenmemektedir. Teka eksterna tabakası **okla** gösterilmiştir (Fotomikrograf x10 büyütme ile görüntülenmiştir.) (**M**:Medulla)

4.2 İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal skorlamalar için gruplar kendi aralarında kontrol, PKOS ve Verteporfin ve immün belirteçlere (YAP1 ve TEAD) göre ayrılmıştır.

Granüloza ve Teka hücreleri ve kist duvarlarındaki pozitif hücre çekirdekleri sayılarında yapılan One-Way ANOVA analizlerinde her üç grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (Tablo VI). Student's t-testi ile yapılan ikili gruplar arası karşılaştırmalarda analiz sonuçlarının büyük çoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlılık bulunmasına rağmen de granüloza hücrelerinde TEAD pozitifliğinde kontrol ve verteporfin grupları ve teka hücrelerinde TEAD pozitifliğinde PKOS ve verteporfin grupları kıyaslamasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Tablo VII-VIII-IX).

PKOS grubunda YAP ve TEAD pozitif hücre çekirdeği sayısı artmış olup Verteporfin grubunda PKOS grubuna göre anlamlı azalma bulunmuştur. PKOS grubunda her denekte korpus luteum gözlemlenemediği örnek sayısı yetersizliği nedeniyle istatistiksel analizlerden çıkarılmıştır.

Tablo VI: Pozitif Hücre Çekirdeği Sayılarının Ortalamaları, Standart Sapmaları ve One Way ANOVA Analizi

	YAPGranüloza (ort+std)	YAPTeka (ort+std)	Anlamlılık (One-Way ANOVA)
Kontrol	200,60±13,55	182,50±15,62	P < 0.001
PKOS	321,88±23,80	260,22±17,33	
Verteporfin	277,20±23,16	198,80±10,48	
	TEADGranüloza (ort+std)	TEADTek (ort+std)	Anlamlılık (One-Way ANOVA)
Kontrol	266,60±42,13	188,50±23,10	P < 0.001
PKOS	325,66±22,04	267,88±28,35	
Verteporfin	266,80±13,76	257,10±8,94	

Tablo VII: Kontrol ve PKOS Grupları Arasındaki Pozitif Çekirdek Sayısı Student's t-Test Analizi

	Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma	Anlamlılık (Student t-Test)
YapGranüloza	Kontrol	10	200,6000	13,55811	P<0,001
	PKOS	9	321,8889	23,80885	
YapTekaHücre si	Kontrol	10	182,5000	15,62228	P<0,001
	PKOS	9	260,2222	17,33333	
TEADGranülo za	Kontrol	10	266,6000	42,13259	P=0,002
	PKOS	9	325,6667	22,04541	
TEADTekaHüc resi	Kontrol	10	188,5000	23,10002	P<0,001
	PKOS	9	267,8889	28,35685	

Tablo VIII: Kontrol ve Verteporfin Grupları Arasındaki Student's t-Test Analizi

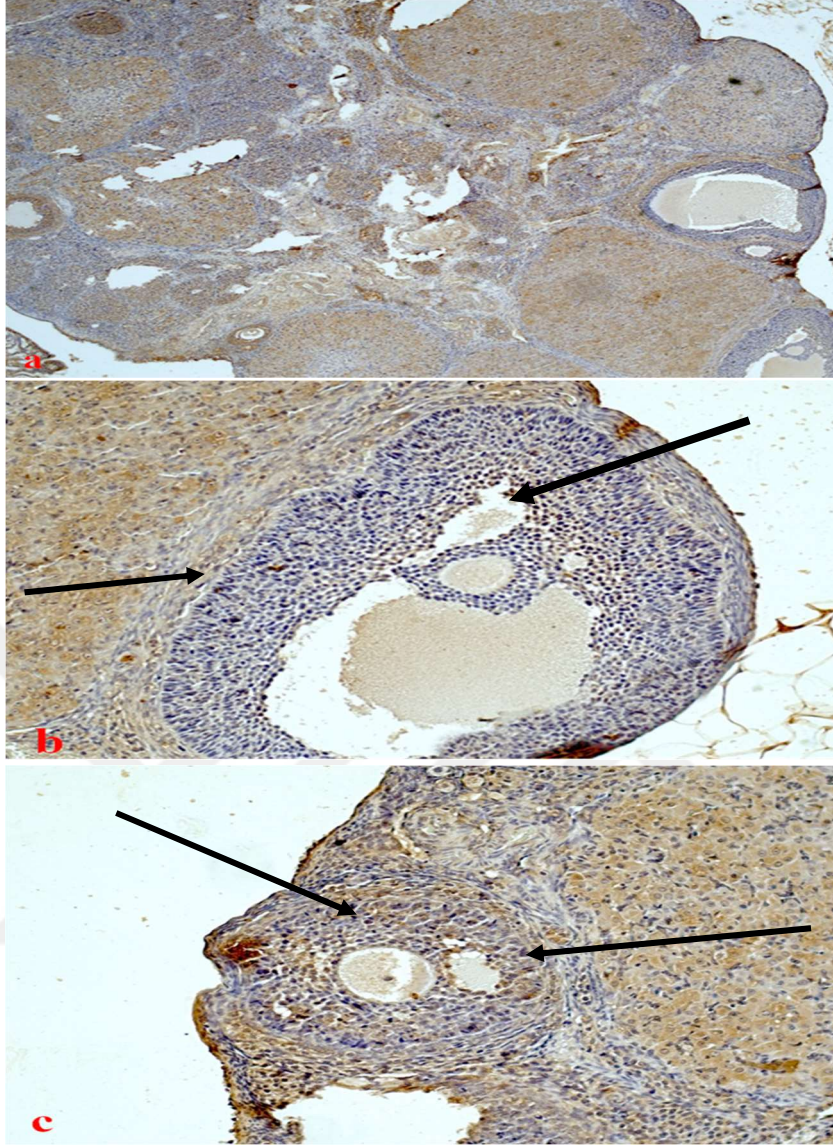
	Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma	Anlamlılık (Student t-Test)
YapGranüloza	Kontrol	10	200,6000	13,55811	P<0,001
	Verteporfin	10	277,2000	23,16511	
YapTekaHücresi	Kontrol	10	182,5000	15,62228	P=0,13
	Verteporfin	10	198,8000	10,48597	
TEADGranüloza	Kontrol	10	266,6000	42,13259	P=0,989
	Verteporfin	10	266,8000	13,76630	
TEADTekaHücresi	Kontrol	10	188,5000	23,10002	P<0,001
	Verteporfin	10	257,1000	8,94986	

Tablo IX: PKOS ve Verteporfin Grupları Arasındaki Student's t-Test Analizi

	Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma	Anlamlılık (Student t-Test)
YapGranüloza	PKOS	9	321,8889	23,80885	P=0,001
	Verteporfin	10	277,2000	23,16511	
YapTekaHücre	PKOS	9	260,2222	17,33333	P<0,001
	Verteporfin	10	198,8000	10,48597	
TEADGranüloza	PKOS	9	325,6667	22,04541	P<0,001
	Verteporfin	10	266,8000	13,76630	
TEADTekaHücre	PKOS	9	267,8889	28,35685	P=0,268
	Verteporfin	10	257,1000	8,94986	

Tablo X: Kistik Yapılarda Pozitif Boyanan Hücre Çekirdeği Sayıları

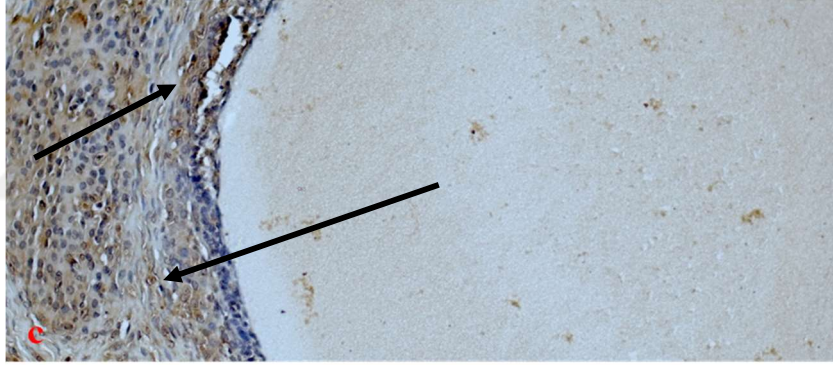
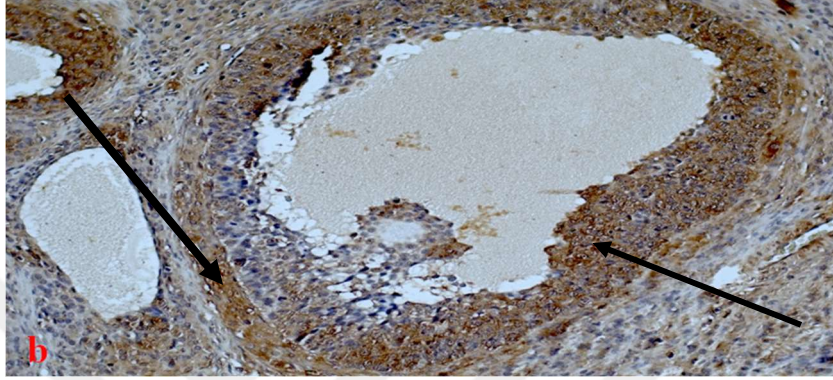
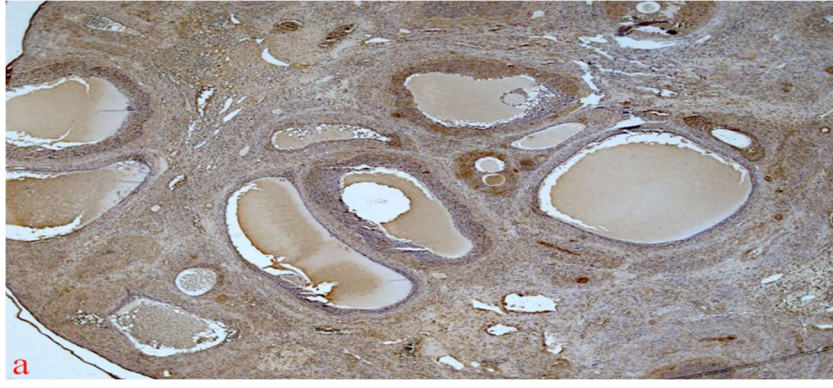
	N	YAPKorpus Luteum(ort+std)	TEADKorpus Luteum(ort+std)
Kontrol	10	60,90±2,81	62,70±2,20
PKOS	5	68,60±1,99	66,60±3,09
Verteporfin	9	68,12±3,97	64,00±1,96



Resim 13a. Kontrol grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması. Yer yer folliküllerde pozitiflik gösteren hücreler mevcuttur. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.)

Resim 13b. Kontrol grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir tersiyer folikül (Fotomikrograf x20büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir. Anti-YAP1 boyamasında folliküller hücrelerde hem çekirdek hem sitoplazma tutulumu vardır.

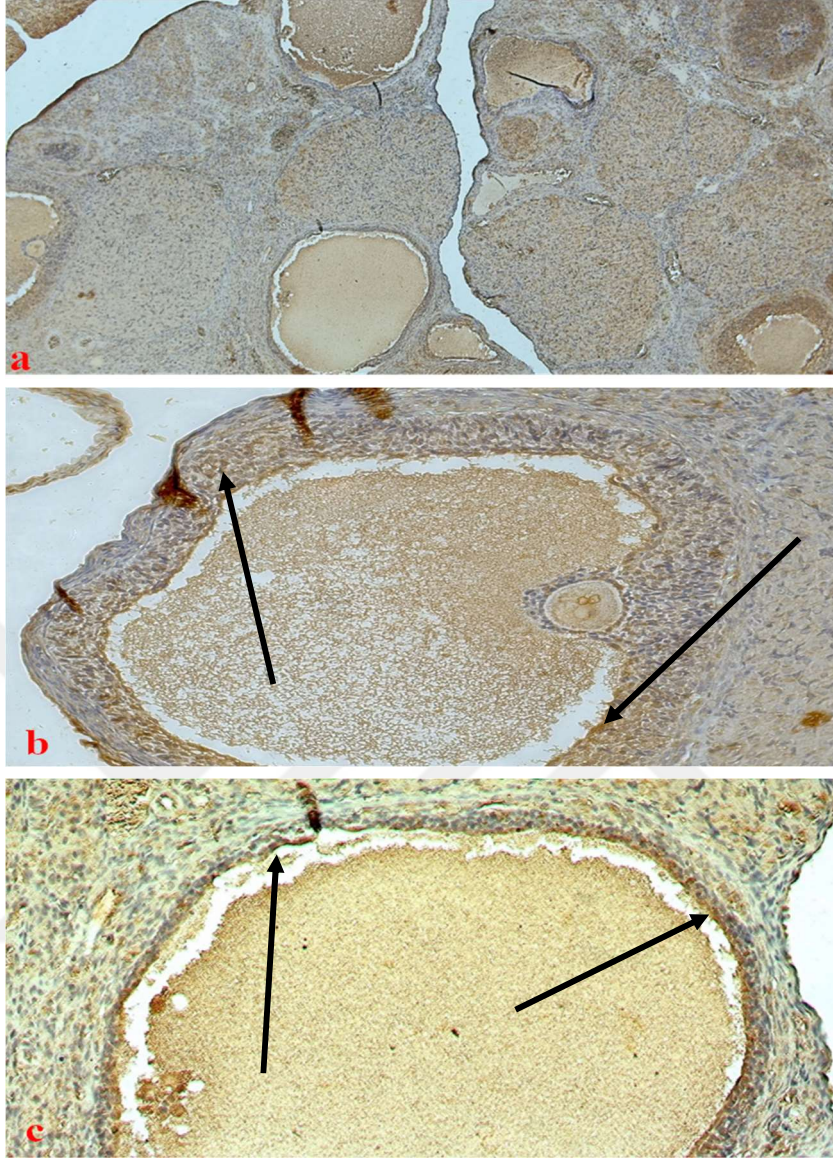
Resim 13c. Kontrol grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir sekonder folikül. (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir. Anti-YAP1 boyamasında folliküller hücrelerde hem çekirdek hem sitoplazma tutulumu vardır.



Resim 14a. PKOS grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) Yer yer folliküllerde ve kistlerde pozitiflik gösteren alanlar mevcuttur ve verteporfin ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış görülmüştür.

Resim 14b. PKOS grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir tersiyer folikül (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir. Kontrol ve verteporfin grubuna göre anlamlı bir artış mevcuttur. Folliküller hücrelerde hem çekirdek hem sitoplazma tutulumu vardır.

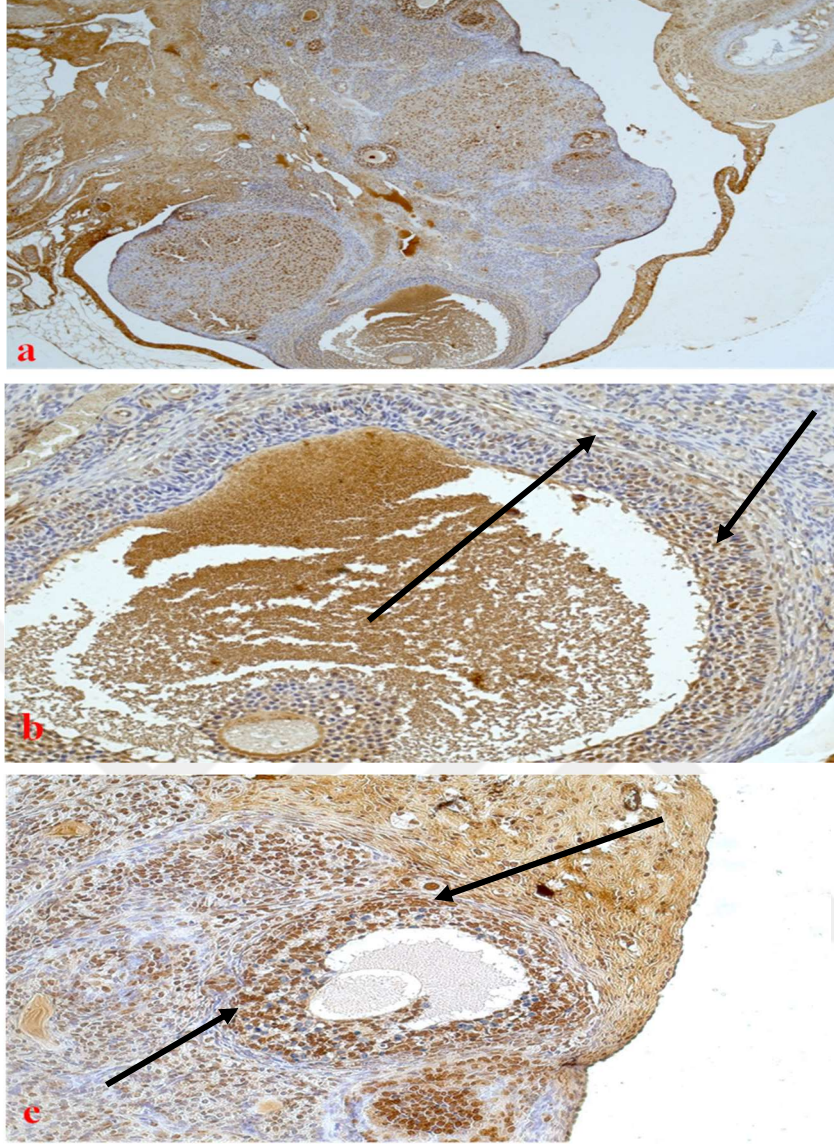
Resim 14c. PKOS grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir Kistik folikül. (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.



Resim-15a: *Verteporfin grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.). Yer yer folliküllerde ve kistlerde pozitiflik gösteren alanlar mevcuttur.*

Resim-15b: *Verteporfin grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir tersiyer folikül (Fotomikrograf x20büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.*

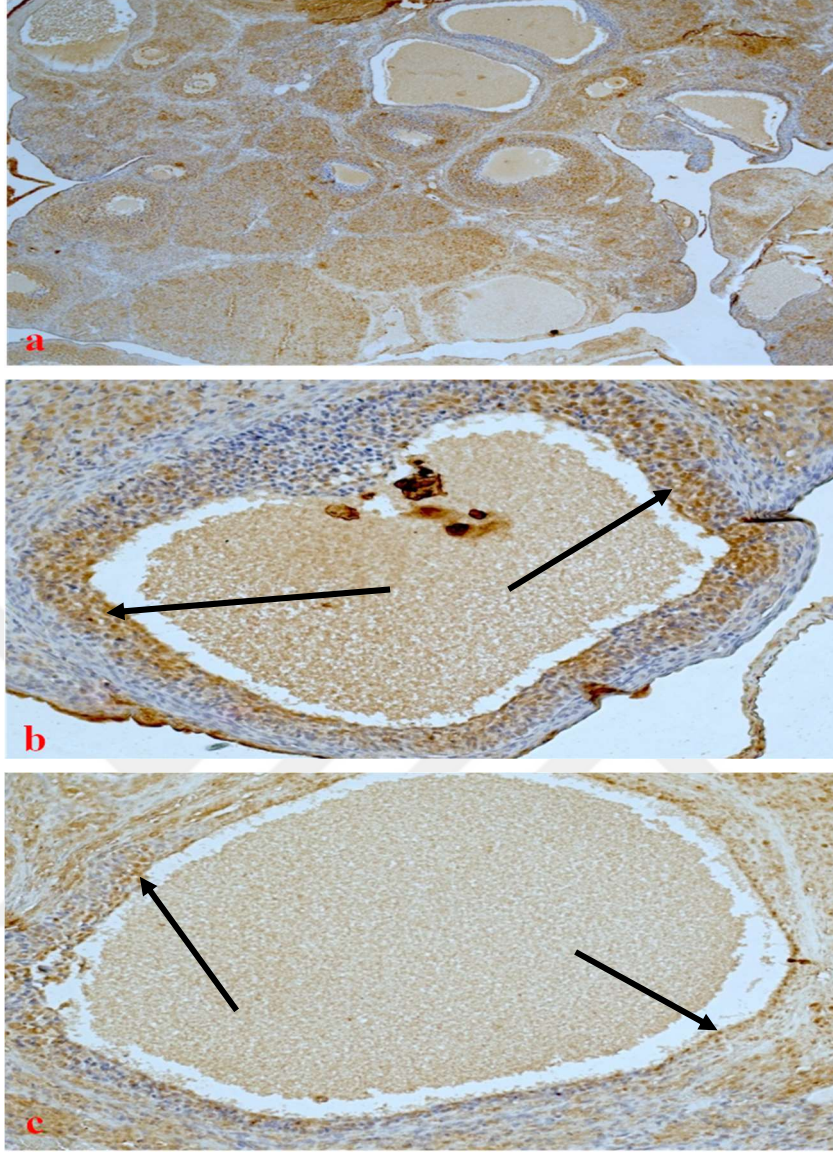
Resim-15c: *Verteporfin grubu over dokusu anti-YAP1 immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir Kistik folikül. (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.*



Resim-16a: Kontrol grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir. Hücrelerin çekirdeğinde tutulum izlenmektedir.

Resim-16b: Kontrol grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir tersiyer folikül (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.

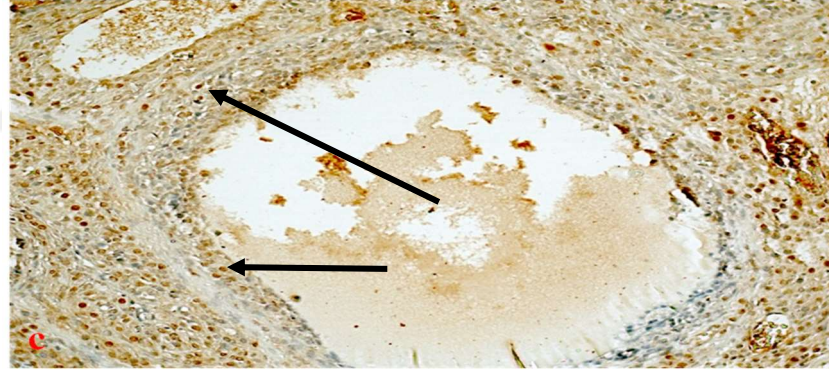
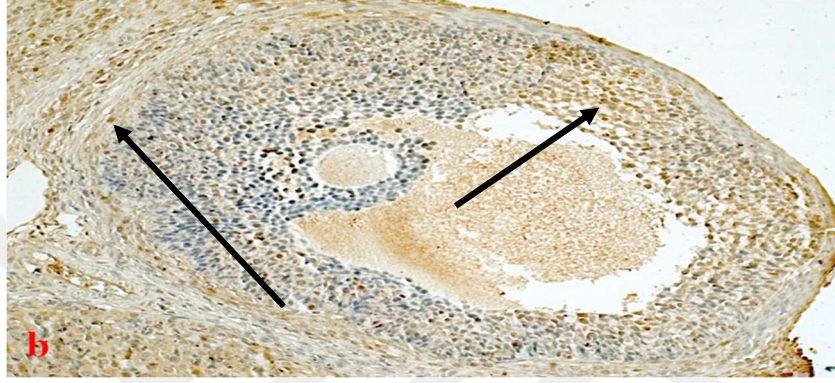
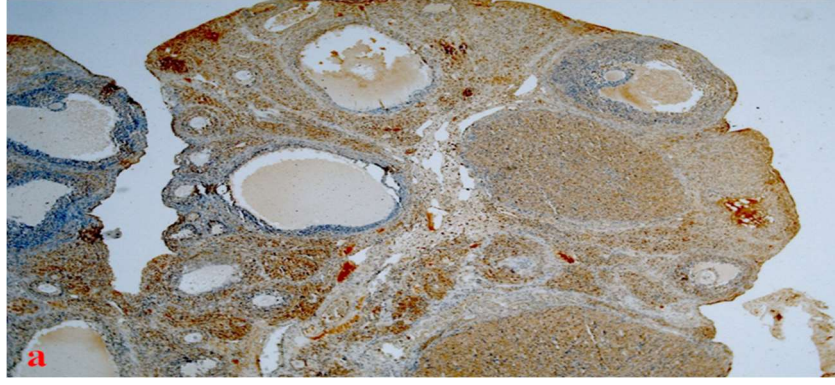
Resim-16c: Kontrol grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir sekonder folikül. (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.



Resim-17a: PKOS grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.)

Resim-17b: PKOS grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir tersiyer folikül (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.

Resim-17c: PKOS grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir Kistik folikül. (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.



Resim-18a: *Verteporfin grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması. (Fotomikrograf x5 büyütme ile görüntülenmiştir.)*

Resim-18b: *Verteporfin grubu over dokusu anti- TEAD immunohistokimya boyaması ile gösterilen bir tersiyer follikül (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) .) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.*

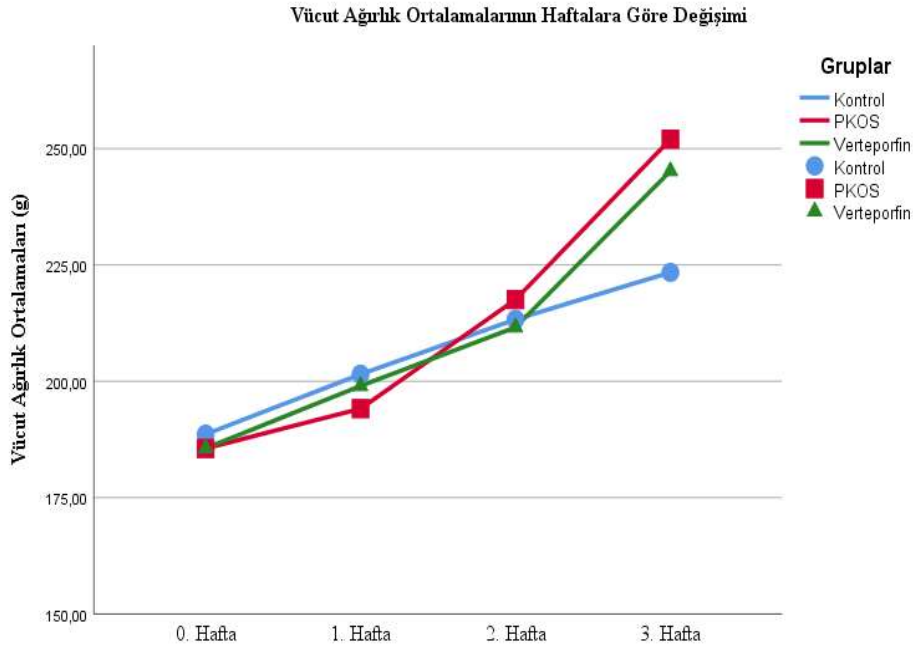
Resim-18c: *Verteporfin grubu over dokusu anti-TEAD immunohistokimya boyaması ile görüntülenenen bir Kistik folikül. (Fotomikrograf x20 büyütme ile görüntülenmiştir.) .) Pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir.*

4.3 Vücut ve Over Ağırlıkları

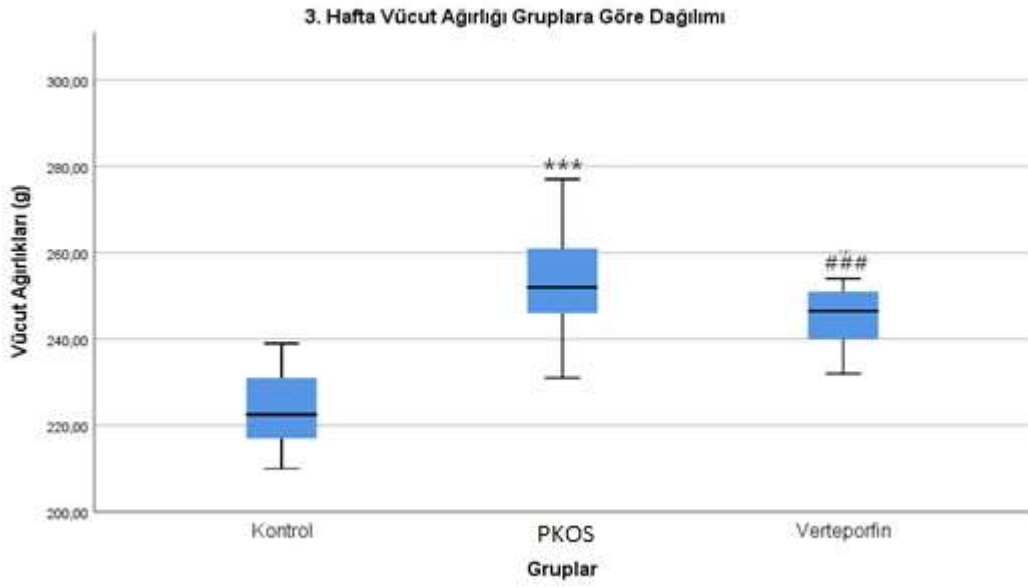
Deneyin başından itibaren sıçanların vücut ağırlıkları düzenli olarak artmıştır, bu artışın en yüksek olduğu grup PKOS grubu olup, verteporfin grubu da benzer bir artış göstermiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olan fark 3. hafta vücut ağırlığında gözlemlenmiştir.

Tablo XI: Vücut ağırlığı ortalamalarının deney haftalarına göre değişimi

Gruplar	Vücut Ağırlığı Ortalamaları $\pm$ std (g)			
	0. Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta
Kontrol	188,6 $\pm$ 7,87	201,5 $\pm$ 4,12	213,30 $\pm$ 9,88	223,40 $\pm$ 10,23
PKOS	185,55 $\pm$ 7,45	194,11 $\pm$ 13,10	217,56 $\pm$ 14,88	252 $\pm$ 14,52
Verteporfin	185,6 $\pm$ 6,93	199 $\pm$ 11,29	211,6 $\pm$ 10,4	245,2 $\pm$ 6,87

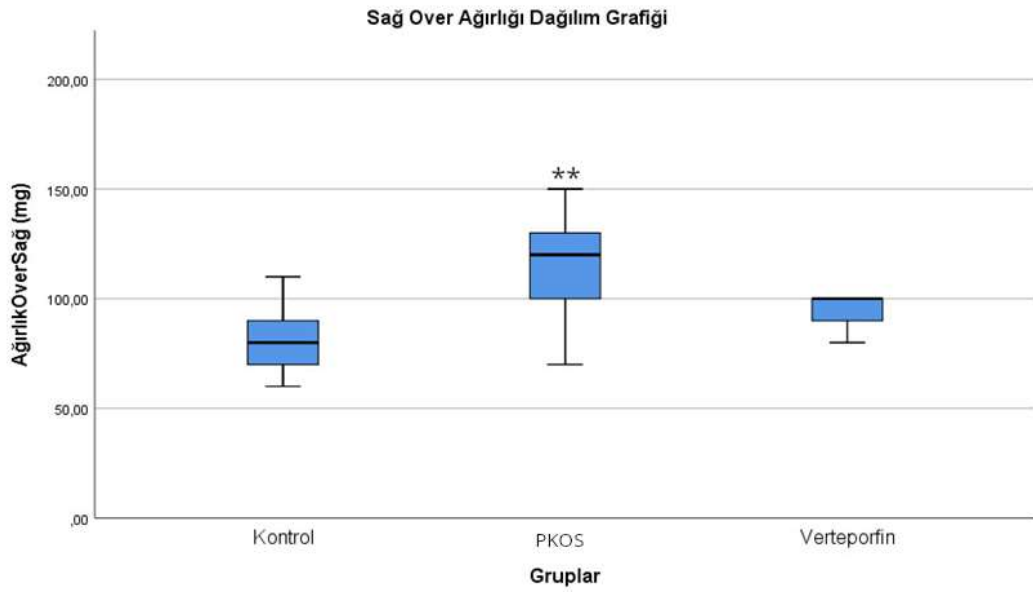


Şekil 1: Vücut ağırlıkları ortalamalarının haftalara göre değişimini gösteren çizgi grafik.

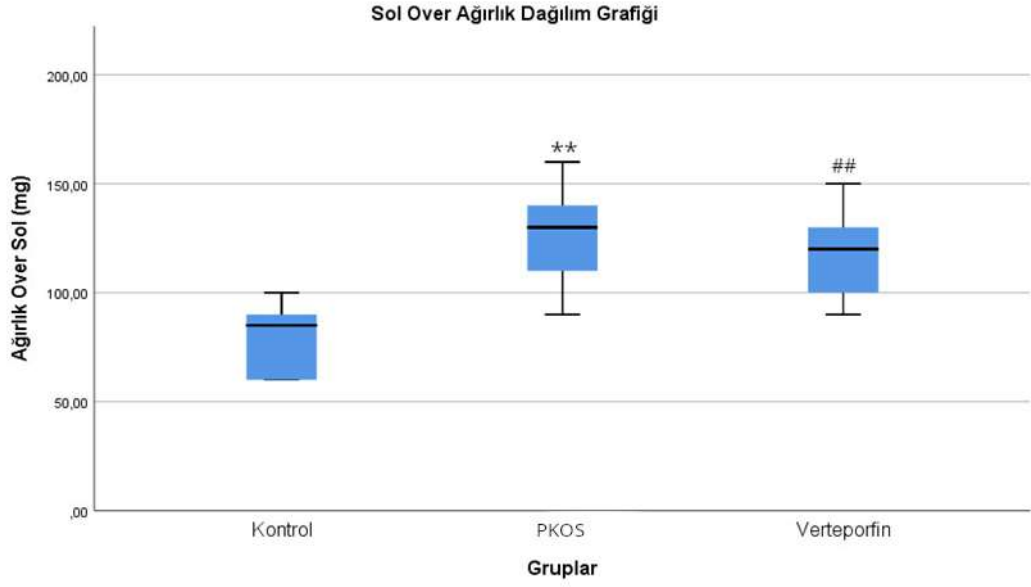


Şekil 2: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında PKOS ve Verteporfin gruplarındaki vücut ağırlığı artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

(*** $P < 0,001$; ### $P < 0,001$).



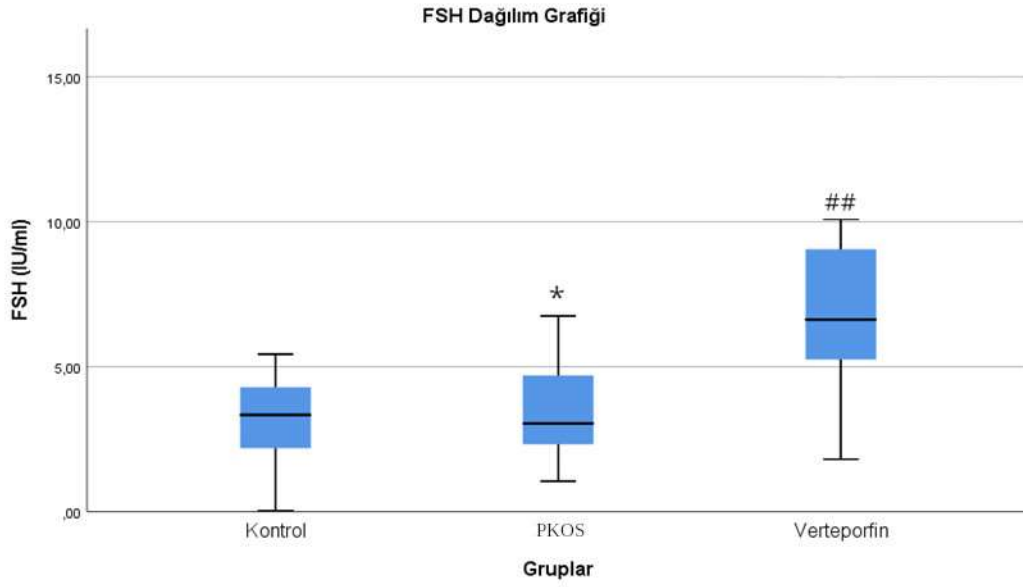
Şekil 3: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında PKOS grubundaki over ağırlık artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (** $P = 0,003$).



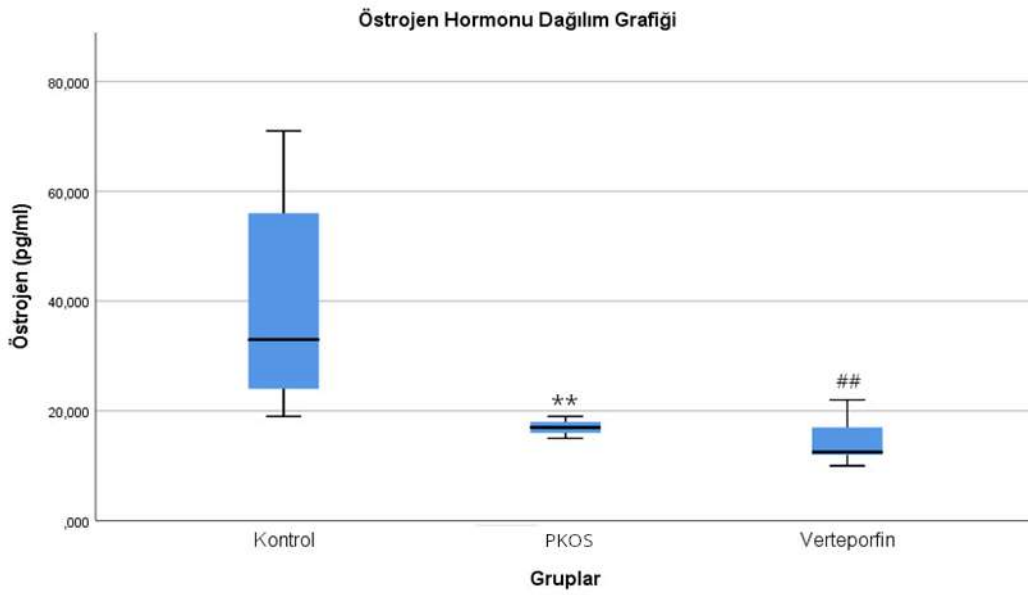
Şekil 4: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında PKOS ve Verteporfin grubundaki over ağırlık artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (** P = 0,003, ## P= 0,001).

4.4 Biyokimya Hormon Analizleri

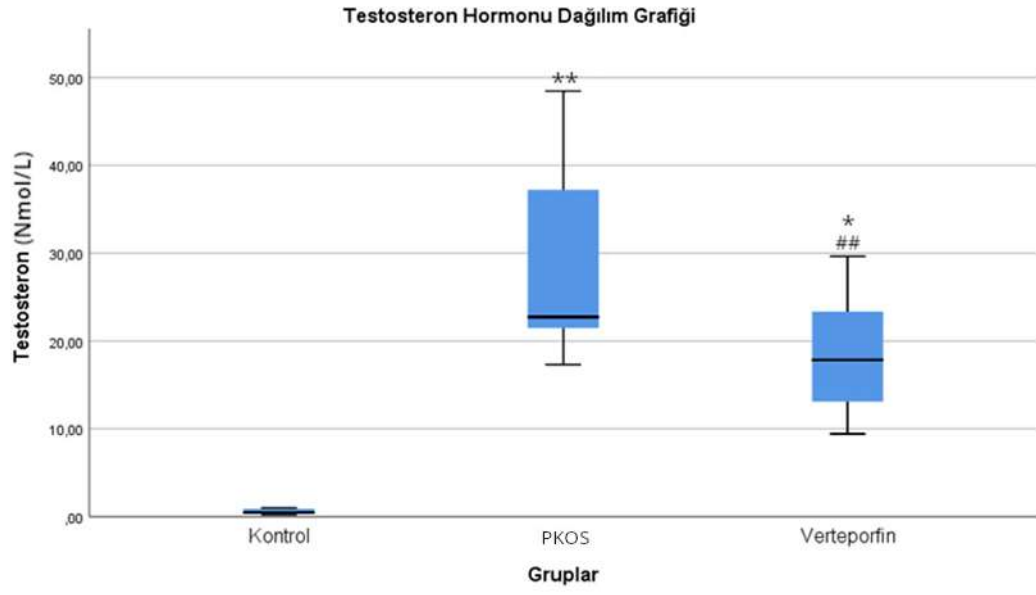
FSH, LH, estradiol (E2) ve testosteron seviyeleri ölçüldüğünde genel olarak FSH ve testosteron seviyelerinde kontrol grubuna göre artış gözlemlenirken, estradiol seviyeleri PKOS ve Verteporfin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. FSH ve testosteron artışları istatistiksel olarak anlamlı iken, LH değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 5: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında kontrol grubuna karşı verteporfin grubundaki FSH artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (## P = 0,004). Aynı zamanda Verteporfin grubunda PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır (* P=0,012)



Şekil 6: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında PKOS ve Verteporfin gruplarındaki östrojen seviyelerindeki azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (** P=0,003; ## P=0,002)



Şekil 7: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında PKOS ve Verteporfin gruplarındaki testosteron seviyelerindeki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (** $P < 0,001$; ## $P < 0,001$). Ayrıca PKOS ve Verteporfin grupları karşılaştırıldığında Verteporfin grubundaki testosteron hormonu seviyesi PKOS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (* $P = 0,03$)

5.TARTIŞMA

PKOS kompleks yapıda ve multisistemik bir sendromdur. Bu sendromun overler üzerindeki etkisinin yanı sıra obezite, insülin direnci, hirsutizm gibi birçok sistemik bulgusu da görülmektedir.

Obezite ve vücut ağırlığı artışı özellikle hiperandrojenizm ve artmış insülin direncine bağlanmaktadır. Özellikle PKOSa sahip kadınların %50-90'ında insülin direnci görüldüğü tespit edilmiştir (93). 2022 yılında Liu ve ark yaptığı çalışmada DHT ile geliştirilen sıçan PKOS modelinde, sıçanlarda gıda alımının arttığı ve hipotalamusta insülin ve leptin sinyallerine yanıtın azaldığı ve BOS'taki leptin seviyelerini baskılanarak obezitenin tetiklendiği gösterilmiştir (94). Wang ve arkadaşlarının letrozol ile geliştirdiği sıçan PKOS modelinde de hiperandrojenizm ve anlamlı vücut ağırlığı artışı bulunmuştur (95). Çalışmamızda da PKOS ve Verteporfin gruplarında görülen hiperandrojenizm sonucu 21. Günde yapılan vücut ağırlığı tartımında PKOS ve verteporfin gruplarında kontrole kıyasla artmış vücut ağırlığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da meydana getirilen hiperandrojenizmin diğer çalışmalarda gösterildiği gibi hipotalamusta insülin ve leptin sinyallerini baskılayarak obeziteyi tetiklediğini düşünmekteyiz.

Over hacmi ve ağırlığı PKOS hastalarında da gelişen kistlere bağlı olarak artmaktadır. Wang ve arkadaşlarının yukarıda bahsedilen çalışmasında ayrıca over hacminin ve ağırlığının da arttığı gösterilmiştir. İbrahim ve ark. geliştirdiği letrozolle indüklenen PKOS modelinde de benzer sonuçlar gösterilmiştir (96). Öte yandan, DHEA ve DHT ile geliştirilen PKOS modellerinde azalmış over ağırlığı ve artmış kist sayısı bulunmuştur (97). Bu yönden çalışmamızdaki PKOS ve Verteporfin grubundaki kontrole göre over ağırlığı artışı insandaki PKOS semptomlarına daha uygun bulunmuştur. Gözlemlerimizden yola çıkarak, çok sayıda kist varlığının over ağırlığını arttırdığı düşünmekteyiz.

Hippo yolağının düzenlenmesi ovaryen follikülerin büyümesi ve gelişmesi için oldukça önem arz etmektedir. YAP/TAZ aktivitesi, özellikle primer ve sekonder folliküllerde granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve foliküllerin büyümeleri için gereklidir. Ancak LH uyarısı ile YAP/TAZ inaktive olmalı ve granüloza hücreleri ovulasyon için proliferasyonu durdurmalı ve terminal hücrelere farklılaşma ile luteal hücrelere dönüşmek zorundadır. PKOS'da görülen hiperandrojenizm LH'ın ovulasyona hazırlayıcı etkilerini bozmakta ve

YAP1'in nükleusa mobilizasyonunu arttırmaktadır. Bu durum sonucunda farklılaşmaya uğrayamayan ve proliferasyonu artan foliküller büyük, kistik yapılara dönüşmektedir. Bu kistik yapılarda granüloza hücreleri luteal faza hazırlık evresini geçiremedikleri için oositin atılmasına yardımcı olamamakta ve bu durum oligo/anovulasyona yol açmaktadır (82). Çalışmamızda YAP1 ve TEAD immunohistokimyasal boyamalarda pozitif hücre sayıları kontrol grubuna göre PKOS ve Verteporfin grubunda artmıştır. Verteporfin grubunda PKOS grubuna göre anlamlı bir azalma mevcuttur. Ancak semi kantitatif analizimiz sonucu kist sayıları bakımından her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bunun sebebi olarak verteporfin grubunda testosteron seviyesinin yeterince azalamaması ve östrojen seviyelerinin yeterince yükselememesinin neden olduğunu düşünmekteyiz. Östrojen reseptörleri, özellikle östrojen reseptör- β granüloza hücreleri farklılaşmasında ve gonadotropinlere olan duyarlılığı düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır (98). Yukarıda sayılan nedenler göz önüne alındığında yaptığımız çalışmada testosteron seviyelerinin verteporfin grubunda PKOS grubuna göre anlamlı olarak azalmasına rağmen yine de kontrol grubuna göre testosteron seviyelerinin yüksek olmasının var olan kistlerin gerilemesine engellediği yolunda bir hipotez oluşturmamıza neden olmuştur. Bu bağlamda gerekirse verteporfin doz artırımı için ileri bir çalışma gerekmektedir.

PKOS'un bir diğer komponenti ise over dokusunda gelişen fibrozistir. Hiperandrojenizm ile geliştirilen deney modellerinde ovaryumların oksidatif strese maruz kaldığı ve fibrozis geliştiği gösterilmiştir (99). Aynı araştırmacılar ayrıca inflazomların da burada rol oynadığı göstermiştir (100). Masson Trikrom ile yaptığımız histokimyasal incelemede özellikle PKOS grubunda medulla bölgesinde boyanmanın diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Her gruptaki testosteron seviyeleri ve hiperandrojenizm varlığı kıyaslandığı zaman elde ettiğimiz bulgular diğer yapılan çalışmalara benzer sonuçlar vermiştir. Çalışmamızda verteporfin grubunda PKOS grubuna kıyasla anlamlı olarak azalan testosteron seviyeleri bize oksidatif stresin de azaldığını ve bu bağlamda fibrozisin de PKOS grubuna göre azaldığını göstermektedir.

FSH azalışı ve LH artışının yanı sıra LH/FSH oranının artması PKOS'un klasik bulgularından biridir. Ancak çalışmamızda PKOS grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber kontrol grubuna göre bir artış gözlenmektedir. Bu tezatlığın nedeni oluşturduğumuz modelden kaynaklanmaktadır. PKOS hayvan modeli oluşturma metodlarının birçoğu deney hayvanlarına dışarıdan dihidroepiandrosteron (DHEA), dihidrotestosteron

(DHT) gibi androjenlerin verilmesiyle veya aromataz inhibitörleri yoluyla hiperandrojenizm oluşturmayı hedeflemektedir. Sıçanlarda oluşturulan bu modellerde artmış FSH, LH, testosteron ve azalmış östrojen ve progesteron seviyeleri gösterilmiştir (101). Letrozolle oluşturulan bu modellerde yüksek FSH ve LH seviyeleri bulunmuştur. Bu durum bizim çalışmamızdaki hormon profilleriyle de örtüşmektedir. FSH ayrıca verteporfin grubunda artmıştır. Fu ve ark. granüloza tümöral hücreleri ile yaptığı çalışmada FSH'ın ile indüklenen aromataz enziminin (CYP19A1) YAP knockdown'u ile aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. (102). Bu durum bizim çalışmamızda da YAP inhibisyonu sonucu aromataz enzim aktivitesinin azaldığını düşündürmektedir. Bu yönde daha ileri araştırma gerekmektedir.

Hiperandrojenizm PKOSda sık görülen bulgulardan biridir. Oluşturulan deney hayvanı modellerinde de hiperandrojenizm indüklenerek geliştirilmektedir. Jovic ve ark. yaptığı testosteron entant ile oluşturulan sıçan modellerinde de serbest testosteronda kontrole kıyasla ciddi bir artış görülmüştür (103). Xu ve ark. letrozol ile oluşturduğu PKOS modelinde benzer şekilde kontrole kıyasla ciddi bir artış görülmüştür (104). Manneras ve ark. yaptığı bir diğer model indükleme çalışmasında ise hem DHT hem de letrozol ile PKOS indüklemesi yapılmış ve karşılaştırma yapılmıştır. Letrozol ile indüklenen PKOS modelinde indüklenen gruptaki testosteron konsantrasyonu kontrole kıyasla önemli derece artmış olarak bulmuştur (105). Letrozolle yaptığımız indüksiyonda PKOS grubunda kontrol grubuna kıyasla biz de testosteron seviyelerinde yaklaşık 50 kat bir artış gözlemledik. Verteporfin grubunda ise PKOS grubuna göre anlamlı bir düşüş olmakla beraber, kontrol grubu ile kıyaslandığında yine de dramatik bir artış bulunmaktadır. Kullandığımız letrozol sayesinde, aromataz enzimi inhibitörü etkisi ile folliküler teka hücrelerince üretilen androjenler, granüloza hücrelerinde östrojene dönüştürülemedi ve dolayısıyla hiperandrojenizm gerçekleşmiştir.

Kullanılan aromataz inhibitörü letrozol östrojen sentezini kısıtlamaktadır. Mihanfar ve ark. oluşturduğu PKOS modelinde de bu azalma gösterilmiş, tedavi için kullanılan metforminin östrojen seviyesinin kontrole seviyesine yaklaşan bir artışa yol açtığı bildirilmiştir (106). Rajan ve ark yaptığı letrozol ile oluşturulan PKOS modelinde ise östrojen seviyelerinde PKOS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görünürken, soya izoflavonoid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (107). Biz de çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla PKOS ve Verteporfin gruplarında anlamlı bir azalma izlerken, PKOS ve Verteporfin grupları arasında anlamlı bir fark bulamadık. Bu durum

verteporfinin aromataz enzim inhibisyonu üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadiğına işaret etmektedir.

Teka hücrelerinde kolesterolden androgen sentezi LH uyarımı aracılığı ile cAMP, fosfokinaz A (PKA) ve cAMP response element-binding (CREB) protein denetimi ile gerçekleşmektedir (108). Wang ve ark yaptığı hepatoselüler kanser çalışmasında YAP'ın CREB'in transkripsiyonel aktivitesini stabilize ettiği ve ayrıca Phospho-MAPK14/p38'i engelleyerek CREB'yi stabilize ettiği ve ayrıca BTRC (Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase) ekspresyonunu azaltarak p38 aracılıklı CREB degradasyonunu da engellediği hipotezi oluşturulmuştur (109). Bu bulgular ele alındığında teka hücresinde verteporfin ve CREB ilişkisinin androgen sentezini baskıladığı yönünde bir öngörü oluşturmaktadır, fakat bu konuda daha ileri araştırma gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmamızda da PKOS'a neden olan hiperandrojenizm ve YAP artışını engelleme amaçlı olarak YAP inhibitörü verteporfini kullandık. Bu çalışma verteporfinin bu amaçla denenmesi adına literatürdeki ilk çalışmalardan biri olmaya aday bir öncü çalışmadır.

Verteporfin overlerde bulunan folliküllerdeki YAP ekspresyonunu ve ayrıca testosteron seviyelerini azaltmasına rağmen overlerde kist sayılarına karşı herhangi bir etkide bulunamadığını gösterdik. Testosteron seviyelerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamı bulursa dahi hiperandrojenizmi tamamen ekarte edecek kadar dramatik bir azalma olmadığını bulduk. Verteporfin dozu birçok in vivo çalışmada farklı seviyelerde kullanılmıştır. Biz çalışmamızı verteporfinin insanlarda rutin olarak kullanılan dozuna yakın bir doz seçimi ile yaptık. Doz düzenlemeleri ile bu bağlamda ileriye yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Hiperandrojenizmin doza bağımlı azalıp azalmadığı in vivo çalışmalarla incelenmeli ve bu anlamda ileri yönelik yapılacak araştırmalar gerektirmektedir.

Granüloza hücrelerinin FSH'a cevabı ve FSH ile indüklenen aromataz enzim sentezi ve bu enzimin YAP1 seviyeleri ile ilişkisi ileri deneylerle gösterilmelidir. Androjen sentezinin teka hücrelerinde düzenlenmesinin kontrolü ve bu kontrolün basamaklarının aydınlatılması için ileriye yönelik moleküler çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Teka hücrelerinde LH uyarımı sonrası artan cAMP, ve cAMP artışına bağlı olan CREB aktivitesi ve bütün bu yolağın YAP ile ilişkisi incelenmelidir. Verteporfinin bu yolaktaki etkileri de ayrıca moleküler düzeyde araştırılması gereken bir konudur.

ÖZET

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN POLİKİSTİK OVER MODELİNDE YAP/TAZ İNHİBİTÖRÜ VERTEPORFİN'İN ETKİSİ

ÇİFTÇİ Y. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı Tıpta Uzmanlık tezi, 2022.

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan endokrin-metabolik hastalıklardandır. YAP proliferasyon ve organ büyümesi ile ilişkili bir proteindir ve hippo yolağının önemli bir transkripsiyonel ko-aktivatörü olarak bilinir. PKOSlu kadınlarda yapılan gen analizlerinde artmış YAP seviyeleri ve promoter geninin hipometilasyonu gösterilmiştir.

Verteporfin bir benzoporfirin türevidir ve ayrıca bir YAP/TAZ yolağı inhibitörüdür. YAP/TEAD etkileşimini bozarak ve YAP'ın sitoplazmada sekestrasyonunu arttırarak YAP degradasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada YAP inhibitörü verteporfin letrozolle indüklenmiş PKOS'lu sıçan modellerine 21. Gün boyunca uygulandı. Kontrol, PKOS ve Verteporfin grubu olmak üzere 3 ayrı grupta deney modeli oluşturulup deneyin 22. Gününde deney hayvanlarından overler ve kan örnekleri alınarak, overlerde histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler; kan serumu örneklerinde ise FSH, LH, östradiol ve testosteron hormonlarının profillerinin incelenmesi yapılmıştır.

Yapılan deney sonuçlarına göre verteporfin grubunda PKOS grubuna göre testosteron seviyesinde anlamlı bir düşme olmasına rağmen over histolojisinde bir iyileşme gözlenememiştir. Bu çalışmanın sonucu ileri zamandaki çalışmalar için ipucu olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Letrozol, YAP, TEAD, PKOS, Verteporfin

SUMMARY

THE EFFECT OF THE YAP/TAZ PATHWAY INHIBITOR VERTEPORFIN ON A LETROZOLE INDUCED RAT MODEL OF POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME

Çiftçi Y. Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology, 2022

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine-metabolic diseases in women of reproductive age. YAP is a protein associated with proliferation and organ growth and is known as an important transcriptional co-activator of the hippo pathway. Gene analyzes of women with PCOS found increased levels of YAP and hypomethylation of the YAP promoter which contributes to the increased levels of YAP.

Verteporfin is a benzoporphyrin derivative and is also an inhibitor of the YAP/TAZ pathway. It plays an important role in the degradation of YAP by disrupting the YAP/TEAD interaction and increasing the sequestration of YAP in the cytoplasm. In this study, the YAP inhibitor verteporfin was administered to rats with letrozole-induced PCOS for 21 days. Experimental model was created as 3 groups: Control, PCOS and Verteporfin, respectively. On the 22nd day of the experiment, blood samples and ovaries taken from study animals. Histochemical and immunohistochemical evaluations conducted for the ovaries. In the blood serum samples, the hormone profiles such as FSH, LH, estradiol and testosterone were analyzed. Although there was a significant decrease in testosterone levels in the verteporfin group compared to the PCOS group, no improvement in ovarian histology was observed. The outcome of this study will be a clue for future studies.

Keywords: Letrozole, YAP, TEAD, PCOS, Verteporfin

KAYNAKLAR

1. **Deswal R, Narwal V, Dang A, Pundir CS.** The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Systematic Review. *J Hum Reprod Sci* [Internet]. 2020 Eki 1 [a.yer 2022 Eki 23];13(4):261. Available from: [/pmc/articles/PMC7879843/](#)
2. **Amisi CA.** Markers of insulin resistance in Polycystic ovary syndrome women: An update. *World J Diabetes* [Internet]. 2022 Mar 15 [a.yer 2022 Eki 23];13(3):129-49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35432749/>
3. **Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED.** Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2020 Eki 1 [a.yer 2022 Eki 23];30(7):399-404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31519403/>
4. **Xu Y, Qiao J.** Association of Insulin Resistance and Elevated Androgen Levels with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): A Review of Literature. *J Healthc Eng* [Internet]. 2022 [a.yer 2022 Eki 23];2022. Available from: [/pmc/articles/PMC8959968/](#)
5. **Ndefo UA, Eaton A, Green MR.** Polycystic Ovary Syndrome: A Review of Treatment Options With a Focus on Pharmacological Approaches. *Pharmacy and Therapeutics* [Internet]. 2013 Haz [a.yer 2022 Eki 23];38(6):336. Available from: [/pmc/articles/PMC3737989/](#)
6. **Coyle C, Campbell RE.** Pathological pulses in PCOS. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2019 Ara 1 [a.yer 2022 Eki 23];498. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31461666/>
7. **Pangas SA, Rajkovic A.** Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. 2015;1:947-95.
8. **Shi Y, Li L, Zhou J, Sun J, Chen L, Zhao J, vd.** Efficacy of electroacupuncture in regulating the imbalance of AMH and FSH to improve follicle development and hyperandrogenism in PCOS rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019 May 1;113.
9. **Tannus S, Burke YZ, Kol S.** Treatment strategies for the infertile polycystic ovary syndrome patient. *Women's Health* [Internet]. 2015 Kas 1 [a.yer 2022 Eki 23];11(6):901-12. Available from: <https://www.obgproject.com/2019/06/12/pcos-part-1-sensitive-care-of-the-pcos-patient/>
10. **Sun D, Li X, He Y, Li W, Wang Y, Wang H, vd.** YAP1 enhances cell proliferation, migration, and invasion of gastric cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget* [Internet]. 2016

- [a.yer 2022 Eki 23];7(49):81062-76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27835600/>
11. **Plewes MR, Hou X, Zhang P, Liang A, Hua G, Wood JR, vd.** Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* [Internet]. 2019 Kas 21 [a.yer 2022 Eki 23];101(5):1001-17. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/101/5/1001/5539731>
 12. **Lv X, He C, Huang C, Wang H, Hua G, Wang Z, vd.** Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development. *The FASEB Journal* [Internet]. 2019 Eyl 1 [a.yer 2022 Eki 23];33(9):10049. Available from: <https://pmc/articles/PMC6704445/>
 13. **Cruess AF, Zlateva G, Pleil AM, Wirostko B.** Photodynamic therapy with verteporfin in age-related macular degeneration: a systematic review of efficacy, safety, treatment modifications and pharmacoeconomic properties. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2009 Mar 1 [a.yer 2022 Eki 23];87(2):118-32. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-3768.2008.01218.x>
 14. **Wei C, Li X.** Verteporfin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in different subtypes of breast cancer cell lines without light activation. *BMC Cancer* [Internet]. 2020 Ara 1 [a.yer 2022 Eki 23];20(1):1-8. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-020-07555-0>
 15. **Dong L, Lin F, Wu W, Liu Y, Huang W.** Verteporfin inhibits YAP-induced bladder cancer cell growth and invasion via hippo signaling pathway. *Int J Med Sci.* 2018 Nis 3;15(6):645-52.
 16. **Lui JW, Xiao S, Ogomori K, Hammarstedt JE, Little EC, Lang D.** The Efficiency of Verteporfin as a Therapeutic Option in Pre-Clinical Models of Melanoma. *J Cancer* [Internet]. 2019 [a.yer 2022 Eki 17];10(1):1-10. Available from: <http://www.jcancer.org>
 17. **Bierbaumer L, Katschnig AM, Radic-Sarikas B, Kauer MO, Petro JA, Högler S, vd.** YAP/TAZ inhibition reduces metastatic potential of Ewing sarcoma cells. *Oncogenesis* [Internet]. 2021 Oca 1 [a.yer 2022 Eki 23];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33419969/>
 18. **Richards JS, Pangas SA.** The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Nis 4 [a.yer 2022 Kas 7];120(4):963. Available from: <https://pmc/articles/PMC2846061/>

19. **Ross H. Michael, Pawlina Wojciech.** Histoloji Konu Anlatımı ve Atlası- İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile| 2011, 6. Baskı. Bölüm 23: Dış Üreme Sistemi Syf 830-843
20. **Karaosmanoglu D, Karcaaltincaba M, Karcaaltincaba D, Akata D, Ozmen M.** MDCT of the ovarian vein: Normal anatomy and pathology. American Journal of Roentgenology [Internet]. 2009 Oca [a.yer 2022 Kas 7];192(1):295-9. Available from: www.ajronline.org
21. **Gray's Anatomy for Students**, 2020,4. Baskı, Chapter 5: Pelvis and Perineum syf. 495-496
22. **McGee EA, Hsueh AJW.** Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. Endocr Rev [Internet]. 2000 Nis 1 [a.yer 2022 Eki 10];21(2):200-14. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/21/2/200/2423956>
23. **DiLuigi A, Weitzman VN, Pace MC, Siano LJ, Maier D, Mehlmann LM.** Meiotic Arrest in Human Oocytes is Maintained by a Gs Signaling Pathway. Biol Reprod [Internet]. 2008 Nis [a.yer 2022 Eki 23];78(4):667. Available from: [/pmc/articles/PMC2322874/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19181424/)
24. **Zhang K, Pollack S, Ghods A, Dicken C, Isaac B, Adel G, vd.** Onset of Ovulation after Menarche in Girls: A Longitudinal Study. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2008 [a.yer 2022 Eki 23];93(4):1186. Available from: [/pmc/articles/PMC2291492/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18444444/)
25. **Wallace WHB, Kelsey TW.** Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. PLoS One [Internet]. 2010 Oca 27 [a.yer 2022 Eki 17];5(1):8772. Available from: [/pmc/articles/PMC2811725/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20444444/)
26. **McGee EA, Horne J.** Follicle Atresia. Encyclopedia of Reproduction. 2018 Oca 1;87-91.
27. **Cui J, Shen Y, Li R.** Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. Trends Mol Med [Internet]. 2013 Mar [a.yer 2022 Eki 23];19(3):197. Available from: [/pmc/articles/PMC3595330/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444444/)
28. **Arendt LM, Kuperwasser C.** Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy. J Mammary Gland Biol Neoplasia [Internet]. 2015 Tem 19 [a.yer 2022 Eki 23];20(0):9. Available from: [/pmc/articles/PMC4596764/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26444444/)
29. **Cable JK, Grider MH.** Physiology, Progesterone. StatPearls [Internet]. 2022 May 8 [a.yer 2022 Eki 23]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558960/>

30. **Hilton HN, Graham JD, Clarke CL.** Minireview: Progesterone Regulation of Proliferation in the Normal Human Breast and in Breast Cancer: A Tale of Two Scenarios? *Molecular Endocrinology* [Internet]. 2015 Eyl 1 [a.yer 2022 Eki 23];29(9):1230-42. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article/29/9/1230/2556720>
31. **Moore L.K,** The Developing Human Clinically Oriented Embryology International Edition 2020, 11. Baskı, Chapter:12 Urogenital System syf 242-245
32. **Li L, Shi X, Shi Y, Wang Z.** The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Front Physiol.* 2021 Eyl 20;12:1610.
33. **Williams CJ, Erickson GF.** Morphology and Physiology of the Ovary. *Endotext* [Internet]. 2012 Oca 30 [a.yer 2022 Eki 23]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
34. **Marlow FL.** Oocyte Polarity and the Embryonic Axes: The Balbiani Body, an Ancient Oocyte Asymmetry. 2010 [a.yer 2022 Eki 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53187/>
35. **Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG.** Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 [a.yer 2022 Eki 11];13(5):1133-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9647533/>
36. **Oktem O, Urman B.** Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction* [Internet]. 2010 Ara 1 [a.yer 2022 Eki 11];25(12):2944-54. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/25/12/2944/552315>
37. **Wassarman PM.** Zona Pellucida Glycoproteins. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Eyl 9 [a.yer 2022 Eki 11];283(36):24285. Available from: [/pmc/articles/PMC2528931/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/182528931/)
38. **Mescher AL, Junqueira LCU.** Junqueira's basic histology: text and atlas", 15. Baskı s. 460-469..
39. **Baumgarten SC, Stocco C.** Granulosa cells. *Encyclopedia of Reproduction.* 2018 Oca 1;8-13.
40. **Mora JM, Fenwick MA, Castle L, Baithun M, Ryder TA, Mobberley M, vd.** Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* [Internet]. 2012 May 1 [a.yer 2022 Eki 11];86(5):153-4. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/86/5/153, 1-14/2541650>

41. Richards JAS, Ren YA, Candelaria N, Adams JE, Rajkovic A. Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update. *Endocr Rev* [Internet]. 2018 [a.yer 2022 Eki 17];39(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC5807095/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/307095/)
42. **Jr. L** “Histology An Essential Textbook,” 2020, Chapter:45 Ovarium, syf:349
43. **Sadler T.W.**, “Langman’s Medical Embriology”, 2019, 14. Baskı. Chapter 2- Gametogenesis: Conversion of Germ Cells into Male and Female Gametes, syf 25-29
44. **He M, Zhang T, Yang Y, Wang C.** Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Mar 19;9:596.
45. **Wei Y, Zhang T, Wang YP, Schatten H, Sun QY.** Polar bodies in assisted reproductive technology: Current progress and future perspectives. *Biol Reprod* [Internet]. 2015 Oca 1 [a.yer 2022 Eki 17];92(1):19-20. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/92/1/19, 1-8/2439433>
46. **Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF.** Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2009 [a.yer 2022 Eki 17];18 Suppl 2(SUPPL. 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19406027/>
47. **A. Kierszenbaum ve L. Tres,** Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 2020. Chapter:22 Folliculogenesis and Menstrual Cycle syf 726-729
48. **Kirkendoll SD, Bacha D.** Histology, Corpus Albicans. *StatPearls* [Internet]. 2022 May 8 [a.yer 2022 Eki 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545270/>
49. **Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB.** Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* [Internet]. 2000 [a.yer 2022 Eki 17];63(5):1245-52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11058526/>
50. **Zhou J, Peng X, Mei S.** Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2019 [a.yer 2022 Eki 17];15(4):726. Available from: [/pmc/articles/PMC6429023/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/329023/)
51. **Azziz R.** Reproductive endocrinology and infertility: Clinical expert series polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology* [Internet]. 2018 [a.yer 2022 Eki 3];132(2):321-336. Available from: https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2018/08000/Polycystic_Ovary_Syndrome.9.aspx

52. **Waldman IN, Legro RS.** Polycystic Ovary Syndrome. The Ovary [Internet]. 2019 Oca 1 [a.yer 2022 Eki 3];415-35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132098000261>
53. **Escobar-Morreale HF.** Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. Nature Reviews Endocrinology 2018 14:5 [Internet]. 2018 Mar 23 [a.yer 2022 Eki 3];14(5):270-84. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2018.24>
54. **Witchel SE, Oberfield SE, Peña AS.** Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment With Emphasis on Adolescent Girls. J Endocr Soc [Internet]. 2019 Haz 26 [a.yer 2022 Eki 3];3(8):1545-73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31384717/>
55. **Sadeghi HM, Adeli I, Calina D, Docea AO, Mousavi T, Daniali M, vd.** Polycystic Ovary Syndrome: A Comprehensive Review of Pathogenesis, Management, and Drug Repurposing. Int J Mol Sci. 2022;2022:583.
56. **Ibáñez L, Oberfield SE, Witchel S, Auchus RJ, Chang RJ, Codner E, vd.** An International Consortium Update: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Polycystic Ovarian Syndrome in Adolescence. Horm Res Paediatr [Internet]. 2017 Ara 1 [a.yer 2022 Eki 3];88(6):371-95. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/479371>
57. **Wang J, Wu D, Guo H, Li M.** Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome. Life Sci. 2019 Kas 1;236:116940.
58. **Jeanes YM, Reeves S.** Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges. Nutr Res Rev [Internet]. 2017 Haz 1 [a.yer 2022 Eki 3];30(1):97-105. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/nutrition-research-reviews/article/metabolic-consequences-of-obesity-and-insulin-resistance-in-polycystic-ovary-syndrome-diagnostic-and-methodological-challenges/576DCD7F46AA15E2CBD6C484D782C1C1>
59. **Zeng X, Xie Y jie, Liu Y ting, Long S lian, Mo Z cheng.** Polycystic ovarian syndrome: Correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity. Clin Chim Acta [Internet]. 2020 Mar 1 [a.yer 2022 Eki 3];502:214-21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733195/>
60. **Kolb H, Stumvoll M, Kramer W, Kempf K, Martin S.** Insulin translates unfavourable lifestyle into obesity. BMC Medicine 2018 16:1 [Internet]. 2018 Ara 13 [a.yer

- 2022 Eki 13];16(1):1-10. Available from: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-018-1225-1>
61. **Li Y, Chen C, Ma Y, Xiao J, Luo G, Li Y, vd.** Multi-system reproductive metabolic disorder: significance for the pathogenesis and therapy of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Life Sci.* 2019 Tem 1;228:167-75.
 62. **Ruddenklau A, Campbell RE.** Neuroendocrine Impairments of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology* [Internet]. 2019 Eki 1 [a.yer 2022 Eki 3];160(10):2230-42. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/160/10/2230/5526761>
 63. **Diamanti-Kandarakis E, Pappalou O, Kandaraki EA.** The Role of Androgen Excess on Insulin Sensitivity in Women. *Front Horm Res* [Internet]. 2019 [a.yer 2022 Eki 13];53:50-64. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/494902>
 64. **Condorelli RA, Calogero AE, di Mauro M, la Vignera S.** PCOS and diabetes mellitus: from insulin resistance to altered beta pancreatic function, a link in evolution. <http://dx.doi.org/101080/0951359020171342240> [Internet]. 2017 Eyl 2 [a.yer 2022 Eki 3];33(9):665-7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09513590.2017.1342240>
 65. **Delitala AP, Capobianco G, Delitala G, Cherchi PL, Dessole S.** Polycystic ovary syndrome, adipose tissue and metabolic syndrome. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2017 Eyl 1 [a.yer 2022 Eki 3];296(3):405-19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643028/>
 66. **Achari AE, Jain SK.** Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Haz 21 [a.yer 2022 Eki 30];18(6). Available from: [/pmc/articles/PMC5486142/](https://pmc/articles/PMC5486142/)
 67. **Messini CI, Vasilaki A, Korona E, Anifandis G, Katsiani E, Georgoulas P, vd.** Effect of adiponectin on estradiol and progesterone secretion from human luteinized granulosa cells in vitro. <https://doi.org/101080/1939636820211929559> [Internet]. 2021 [a.yer 2022 Eki 30];67(5):374-82. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19396368.2021.1929559>
 68. **Barbe A, Bongrani A, Mellouk N, Estienne A, Kurowska P, Grandhaye J, vd.** Mechanisms of Adiponectin Action in Fertility: An Overview from Gametogenesis to Gestation in Humans and Animal Models in Normal and Pathological Conditions. *Int J Mol*

- Sci [Internet]. 2019 Nis 1 [a.yer 2022 Eki 30];20(7):1526. Available from: /pmc/articles/PMC6479753/
69. **Reneau J, Goldblatt M, Gould J, Kindel T, Kastenmeier A, Higgins R, vd.** Effect of adiposity on tissue-specific adiponectin secretion. PLoS One [Internet]. 2018 Haz 1 [a.yer 2022 Eki 30];13(6). Available from: /pmc/articles/PMC6010237/
 70. **Panidis D, Farmakiotis D, Rousso D, Kourtis A, Katsikis I, Krassas G.** Obesity, weight loss, and the polycystic ovary syndrome: effect of treatment with diet and orlistat for 24 weeks on insulin resistance and androgen levels. Fertil Steril [Internet]. 2008 Nis [a.yer 2022 Eki 31];89(4):899-906. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17980364/>
 71. **Hakimi O, Cameron LC.** Effect of Exercise on Ovulation: A Systematic Review. Sports Medicine 2016 47:8 [Internet]. 2016 Ara 29 [a.yer 2022 Eki 3];47(8):1555-67. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-016-0669-8>
 72. **Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, vd.** Clinical Practice Guideline: Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2013 [a.yer 2022 Eki 30];98(12):4565. Available from: /pmc/articles/PMC5399492/
 73. **Badouel C, Mcneill H.** Proapoptosis genes SnapShot: The Hippo Signaling Pathway. Cell. 2011;145:484-484.e1.
 74. **Maugeri-Saccà M, de Maria R.** The Hippo pathway in normal development and cancer. Pharmacol Ther [Internet]. 2018 Haz 1 [a.yer 2022 Eki 3];186:60-72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29305295/>
 75. **Liu S, Miao R, Zhai M, Pang Q, Deng Y, Liu S, vd.** Effects and related mechanisms of serotonin on malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma via regulation of Yap. Oncotarget [Internet]. 2017 [a.yer 2022 Eki 3];8(29):47412-24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28537892/>
 76. **Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, vd.** Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. Hum Pathol. 2008 Kas 1;39(11):1582-9.
 77. **Schumacher B, Skwarczynska M, Rose R, Ottmann C.** Structure of a 14-3-3 σ -YAP phosphopeptide complex at 1.15 Å resolution. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun [Internet]. 2010 Eyl 9 [a.yer 2022 Kas 11];66(Pt 9):978. Available from: /pmc/articles/PMC2935210/

78. **Dong X, Meng L, Liu P, Ji R, Su X, Xin Y, vd.** YAP/TAZ: A promising target for squamous cell carcinoma treatment. *Cancer Manag Res.* 2019;11:6245-52.
79. **Yuan M, Tomlinson V, Lara R, Holliday D, Chelala C, Harada T, vd.** Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. *Cell Death Differ* [Internet]. 2008 [a.yer 2022 Eki 3];15(11):1752-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18617895/>
80. **Qadir J, Riaz SK, Taj K, Sattar N, Sahar NE, Khan JS, vd.** Increased YAP1 expression is significantly associated with breast cancer progression, metastasis and poor survival. *Future Oncol* [Internet]. 2021 Tem 1 [a.yer 2022 Eki 30];17(21):2725-34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33880946/>
81. **Li T, Zhao H, Zhao X, Zhang B, Cui L, Shi Y, vd.** Identification of YAP1 as a novel susceptibility gene for polycystic ovary syndrome. *J Med Genet* [Internet]. 2012 Nis 1 [a.yer 2022 Eki 3];49(4):254-7. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/49/4/254>
82. **Ji SY, Liu XM, Li BT, Zhang YL, Liu H bin, Zhang YC, vd.** The polycystic ovary syndrome-associated gene Yap1 is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2017 Eki 1 [a.yer 2022 Eki 3];23(10):698-707. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article/23/10/698/4080182>
83. **Jiang L le, Xie JK, Cui JQ, Wei D, Yin BL, Zhang YN, vd.** Promoter methylation of yes-associated protein (YAP1) gene in polycystic ovary syndrome. *Medicine* [Internet]. 2017 [a.yer 2022 Eki 3];96(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35266164/>
84. **Scott LJ, Goa KL.** Verteporfin. *Drugs Aging* [Internet]. 2000 [a.yer 2022 Eki 3];16(2):139-46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10755329/>
85. **Chen WS, Cao Z, Krishnan C, Panjwani N.** Verteporfin without light stimulation inhibits YAP activation in trabecular meshwork cells: Implications for glaucoma treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Eki 16;466(2):221-5.
86. **Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, vd.** Genetic and pharmacological disruption of the TEAD–YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* [Internet]. 2012 Haz 15 [a.yer 2022 Eki 3];26(12):1300-5. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/26/12/1300.full>

87. **Wang C, Zhu X, Feng W, Yu Y, Jeong K, Guo W, vd.** Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2016 [a.yer 2022 Eki 3];6(1):27. Available from: [/pmc/articles/PMC4759394/](#)
88. **Vigneswaran K, Boyd NH, Oh SY, Lallani S, Boucher A, Neill SG, vd.** YAP/TAZ Transcriptional Coactivators Create Therapeutic Vulnerability to Verteporfin in EGFR-mutant Glioblastoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2021 Mar 1 [a.yer 2022 Eki 3];27(5):1553-69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33172899/>
89. **Shi G, Wang H, Han H, Gan J, Wang H.** Verteporfin enhances the sensitivity of LOVO/TAX cells to taxol via YAP inhibition. *Exp Ther Med* [Internet]. 2018 Eyl 1 [a.yer 2022 Kas 7];16(3):2751-5. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6447/abstract>
90. **Michy T, Massias T, Bernard C, Vanwonderghem L, Henry M, Guidetti M, vd.** Verteporfin-Loaded Lipid Nanoparticles Improve Ovarian Cancer Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Kas 1 [a.yer 2022 Kas 7];11(11). Available from: [/pmc/articles/PMC6896159/](#)
91. **Gogoi RP, Dasari VR.** Abstract A23: Verteporfin as a new treatment paradigm for platinum-resistant ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Research* [Internet]. 2020 Ağu 1 [a.yer 2022 Kas 7];18(8_Supplement):A23-A23. Available from: https://aacrjournals.org/mcr/article/18/8_Supplement/A23/233550/Abstract-A23-Verteporfin-as-a-new-treatment
92. **Reddy PS, Begum N, Mutha S, Bakshi V.** Beneficial effect of Curcumin in Letrozole induced polycystic ovary syndrome. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2016 Nis 1;5(2):116-22.
93. **Barber TM, Hanson P, Weickert MO, Franks S.** Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clin Med Insights Reprod Health* [Internet]. 2019 Oca [a.yer 2022 Eki 11];13:117955811987404. Available from: [/pmc/articles/PMC6734597/](#)
94. **Liu Y, Xu YC, Cui YG, Jiang SW, Diao FY, Liu JY, vd.** Androgen Excess Increases Food Intake in a Rat Polycystic Ovary Syndrome Model by Downregulating Hypothalamus Insulin and Leptin Signaling Pathways Preceding Weight Gain. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2022 [a.yer 2022 Eki 13];112(10):966-81. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/521236>

95. **Wang MX, Yin Q, Xu X.** A Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome with Insulin Resistance Induced by Letrozole Combined with High Fat Diet. *Med Sci Monit* [Internet]. 2020 May 25 [a.yer 2022 Eki 13];26:e922136-1. Available from: [/pmc/articles/PMC7268891/](#)
96. **Ibrahim YF, Alorabi M, Abdelzaher WY, Toni ND, Thabet K, Hegazy AR, vd.** Diacerein ameliorates letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 May 1;149:112870.
97. **Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ.** Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod* [Internet]. 2012 May 1 [a.yer 2022 Eki 13];86(5):149-50. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/86/5/149, 1-12/2541646>
98. **Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS.** Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology* [Internet]. 2005 Ağu [a.yer 2022 Eki 11];146(8):3247-62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831568/>
99. **Wang D, Wang T, Wang R, Zhang X, Wang L, Xiang Z, vd.** Suppression of p66Shc prevents hyperandrogenism-induced ovarian oxidative stress and fibrosis. *J Transl Med* [Internet]. 2020 Şub 17 [a.yer 2022 Eki 11];18(1):1-15. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02249-4>
100. **Wang D, Weng Y, Zhang Y, Wang R, Wang T, Zhou J, vd.** Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice. *Science of The Total Environment*. 2020 Kas 25;745:141049.
101. **Osuka S, Nakanishi N, Murase T, Nakamura T, Goto M, Iwase A, vd.** Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. *Reprod Med Biol* [Internet]. 2019 Nis 1 [a.yer 2022 Eki 11];18(2):151. Available from: [/pmc/articles/PMC6452010/](#)
102. **Fu D, Lv X, Hua G, He C, Dong J, Lele SM, vd.** YAP Regulates Cell Proliferation, Migration, and Steroidogenesis in Adult Granulosa Cell Tumors. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2014 [a.yer 2022 Eki 17];21(2):297. Available from: [/pmc/articles/PMC4222524/](#)
103. **Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, vd.** Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2021 [a.yer 2022 Eki 13];2021:16. Available from: [/pmc/articles/PMC8426083/](#)

104. **Xu J, Dun J, Yang J, Zhang J, Lin Q, Huang M, vd.** Letrozole Rat Model Mimics Human Polycystic Ovarian Syndrome and Changes in Insulin Signal Pathways. *Med Sci Monit* [Internet]. 2020 [a.yer 2022 Eki 13];26:e923073-1. Available from: [/pmc/articles/PMC7366789/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011111/)
105. **Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, vd.** A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology* [Internet]. 2007 Ağu 1 [a.yer 2022 Eki 13];148(8):3781-91. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/148/8/3781/2502132>
106. **Mihanfar A, Nouri M, Roshangar L, Khadem-Ansari MH.** Ameliorative effects of fisetin in letrozole-induced rat model of polycystic ovary syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2021 Eki 1;213.
107. **Rajan RK, Kumar M. SS, Balaji B.** Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharm Biol* [Internet]. 2017 Oca 1 [a.yer 2022 Eki 14];55(1):242-51. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880209.2016.1258425>
108. **Nikhil Kumar Tej J, Johnson P, Krishna K, Kaushik K, Gupta PSP, Nandi S, vd.** Copper and Selenium stimulates CYP19A1 expression in caprine ovarian granulosa cells: possible involvement of AKT and WNT signalling pathways. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2021 Nis 1 [a.yer 2022 Eki 17];48(4):3515-27. Available from: https://www.researchgate.net/publication/351036777_Copper_and_Selenium_stimulates_CYP19A1_expression_in_caprine_ovarian_granulosa_cells_possible_involvement_of_AKT_and_WNT_signalling_pathways
109. **Wang J, Ma L, Weng W, Qiao Y, Zhang Y, He J, vd.** Mutual interaction between YAP and CREB promotes tumorigenesis in liver cancer. *Hepatology*. 2013 Eyl;58(3):1011-20.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 17/12/2020

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2020 Yılı VII. Oturum
Sayı : 64583101/2020/127
Proje Başlığı : Sıçanlarda Polikistik Over Modelinde YAP/TAZ Yolağı inhibitörü olan Verteporfin'in Etkisi.
Proje Yürütücüsü : Kemal ERGİN
Proje Ekibi : Yiğitcan ÇİFTÇİ

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması

İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof.Dr. Murat SARIERLER
Başkan

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Turhan DOST
Üye

Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN
Üye

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye

Doç. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

(Toplantıya Katılmadı)
Dr. Öğr. Üyesi Umut
DEMETOĞLU
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder
ÜSTÜNDAĞ
Üye

(Toplantıya Katılmadı)
Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Solmaz
KARAARSLAN
Üye

Öğr. Gör. Dr. Asude Gülce
GÜLER Sor. Vet. Hek.
Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ
Sor. Vet. Hek.
Üye

(Toplantıya Katılmadı)
Hidayet YAMAN
Serbest Vet. Hek. Üye

Şenay TEKİNBAŞ
HAYTAP Üye.

(Toplantıya Katılmadı)
Mustafa ÇOBANOĞLU
Sivil Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.