



T. C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**JUVENİL DÖNEMDE YÜKSEK FRUKTOZ İÇERİKLİ DİYETLE
BESLENMENİN PERİLİPİN EKSPRESYONU ÜZERİNDEN
POLİKİSTİK OVER SENDROMU GELİŞİMİ İLE İLİŞKİSİ**

NEJDA BEDRİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL-2016



T. C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**JUVENİL DÖNEMDE YÜKSEK FRUKTOZ İÇERİKLİ DİYETLE
BESLENMENİN PERİLİPİN EKSPRESYONU ÜZERİNDEN
POLİKİSTİK OVER SENDROMU GELİŞİMİ İLE İLİŞKİSİ**

NEJDA BEDRİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL-2016

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. İlknur Keskin'e,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarıma,

Çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma,

Yüksek lisans tez çalışmam ile ilgili tüm emekleri için değerli REMER çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan sevgili eşim Bülent Bedri'ye,

Tüm eğitim hayatım boyunca bana destek oldukları için sevgili ailemin tüm fertlerine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER.....	6
4.1.Ovaryumlar.....	6
4.1.1.Ovaryum Embriyolojisi	6
4.1.2.Ovaryum Anatomisi.....	7
4.1.3.Ovaryum Histolojisi.....	9
4.1.4.Foliküler Gelişim (Folikülogenez).....	10
4.1.4.1.Primordiyal Folikül	11
4.1.4.2.Primordiyal Folikül Seçilimi (Primordiyal Foliküllerden Primer Foliküllere Geçiş).....	11
4.1.4.3.Primer Folikül	12
4.1.4.4.Sekonder Folikül	13
4.1.4.5.Antral (Graaf) Folikül	14
4.1.4.6.Folikül Atrezisi	15
4.1.5.Dominant Folikül Seçilimi	16
4.1.5.1.Dominant Folikül Seçiliminde Otokrin ve Parakrin Mekanizmalar ...	16

4.1.6.Ovulasyon	17
4.1.6.1.Ovulasyonun Hormonal Regülasyonu	17
4.1.7.Oogenez	18
4.1.8.Korpus Luteum	19
4.2.Polikistik Over Sendromu (PCOS).....	20
4.2.1.PCOS Klinik Özellikleri ve Tanısı	21
4.2.2.PCOS ve Oosit Gelişimi	23
4.2.3.Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH)	23
4.2.4.Hiperandrojenemi	26
4.2.5.Hiperinsulinemi	26
4.2.6.Androjen Biyogenezi	27
4.3.Fruktoz.....	28
4.3.1.Fruktozun Emilimi, Taşınması ve Hücreye Girişi	29
4.3.2.Fruktozun Hücre İçi Metabolizması	29
4.3.3.Fruktoz ve Enerji Metabolizması.....	30
4.3.4.Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (High Fructose Corn Syrup-HFCS)	30
4.4.Yağ Damlacıkları ve Hücrel Lipid Metabolizması	31
4.5.PAT Protein Ailesi	31
4.5.1.Perilipin 2.....	34
4.5.1.1.Perilipin 2 ve Adipogenez	34
4.5.1.2.PLIN1 null farelerde PLIN2.....	34
4.5.1.3.Hücrel lipid metabolizmasında PLIN2'nin fonksiyonu.....	34
4.5.1.4.PLIN2 null fare modelleri	35
4.5.1.5.PLIN2 ve lipoprotein metabolizması	35
4.5.1.6.PLIN2 ekspresyon ve fonksiyonunun regülasyonu.....	35
4.5.2.Perilipin 3.....	36

4.5.2.1.PLIN3'ün yapısı	36
5.GEREÇ VE YÖNTEM	38
5.1.Deney Hayvanları ve Deney Planı	42
5.1.1.Çalışma Grupları.....	42
5.2.Kan Örneklerinin Alınması	43
5.3.Ovaryum Diseksiyonu	44
5.4.Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	44
5.5.Hematoksilen ve Eozin Boyama ile Genel Histolojik İnceleme	45
5.6.İmmunfloresan Yöntemi.....	45
5.7.Western Blot Analizi	46
5.7.1.Doku Ekstraktı Hazırlanması.....	46
5.7.2.Western Blot Yöntemi	46
5.8.ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	47
5.8.1.ELISA Yöntemi	47
5.9.İstatistiksel Değerlendirme	50
6.BULGULAR	51
6.1.Deneklerin Ağırlık Değerlendirilmesi	51
6.2.Hematoksilen ve Eozin Boyama ile Grupların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	52
6.3.İmmunfloresan Yöntemi Bulguları	56
6.3.1.PLIN2.....	57
6.3.2.PLIN3.....	64
6.4.Western Blot Analizi Bulguları	71
6.5.ELISA Bulguları.....	73
7.TARTIŞMA VE SONUÇ	76
8.KAYNAKLAR	81

9.ETİK KURUL ONAYI	102
10.ÖZGEÇMİŞ	104



TABLO LİSTESİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 4.2.	PCOS tanı kriterleri	21
Tablo 4.2.1.	2003 Rotterdam kriterlerine göre PCOS fenotipleri	22
Tablo 4.5.	PAT proteinlerinin isimlendirilmesi	33
Tablo 5.1.1.	Çalışma grupları	43
Tablo 5.4.	Işık Mikroskobu- İmmunfloresan metodu için doku takip protokolü	44
Tablo 5.5.	Hematoksilen ve Eozin boyama aşamaları	45
Tablo 6.3.1.	Folikülün farklı gelişim aşamalarında PLIN2 immün işaretlenme yoğunluğu	57
Tablo 6.3.2.	Folikülün farklı gelişim aşamalarında PLIN3 immün işaretlenme yoğunluğu	64

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 4.1.1.	Memeli dişi germ hücre gelişimi	7
Şekil 4.1.2.1.	İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı	8
Şekil 4.1.2.2.	Farede ovaryumların yerleşimi	8
Şekil 4.1.3.	Ovaryum histolojisi	9
Şekil 4.1.4.2.	Foliküler gelişimde primordiyal, primer ve sekonder foliküllerin morfolojik görüntüsü	12
Şekil 4.1.4.5.	Graaf folikülü	15
Şekil 4.1.6.1.	FSH ve LH hormonlarının ovaryumdaki etkileri	18
Resim 4.2.1.	Normal ve Polikistik ovaryumun ultrason görüntüsü	23
Şekil 4.2.3.1.	Teka ve granüloza hücrelerindeki LH ve FSH yanıtları	24
Şekil 4.2.3.2.	Erken foliküler fazda hormonal etkileşimler	24
Şekil 4.2.3.3.	PCOS'ta hormonal etkileşimler	25
Şekil 4.3.2.	Fruktoz metabolizması	29
Şekil 4.3.4.	1985-2015 yılları arasında HFCS kullanım oranları	31
Şekil 4.5.	PAT protein ailesi üyeleri yapısal özellikleri	33
Şekil 6.1.	Gruplar arasında ağırlıkların karşılaştırılması	51
Resim 6.2.1.	HF-1 grubu ovaryumu	52
Resim 6.2.2.	HF-2 grubu ovaryumu	53
Resim 6.2.3.	Hormon grubu ovaryumu	54
Resim 6.2.4.	Kontrol grubu ovaryumu	55
Resim 6.2.5.	Kontrol grubu ovaryumu korpus luteum yapısı	55
Resim 6.3.1.	Kontrol grubu PLIN2 negatif kontrol kesitleri	56
Resim 6.3.2.	Kontrol grubu PLIN3 negatif kontrol kesitleri	56
Resim 6.3.1.1.	HF-1 grubu PLIN2 immün işaretlenme yoğunluğu	58
Resim 6.3.1.2.	HF-2 grubu PLIN2 immün işaretlenme yoğunluğu	59
Resim 6.3.1.3.	Hormon grubu PLIN2 immün işaretlenme	60

	yoğunluğu	
Resim 6.3.1.4.	Kontrol grubu PLIN2 immün işaretlenme yoğunluğu	61
Resim 6.3.1.5.	HF-1 ve Hormon grubu preantral folikül PLIN2 karşılaştırması	62
Resim 6.3.1.6.	PLIN2'nin oosit sitoplazmasında ve granüloza hücre sitoplazmasında immün işaretlenme	63
Resim 6.3.2.1.	HF-1 grubu PLIN3 immün işaretlenme yoğunluğu	65
Resim 6.3.2.2.	HF-2 grubu PLIN3 immün işaretlenme yoğunluğu	66
Resim 6.3.2.3.	Hormon grubu PLIN3 immün işaretlenme yoğunluğu	67
Resim 6.3.2.4.	Kontrol grubu PLIN3 immün işaretlenme yoğunluğu	68
Resim 6.3.2.5.	HF-1 ve Hormon grubu primer folikül	69
Resim 6.3.2.6.	PLIN3'ün oosit sitoplazmasında ve granüloza hücre sitoplazmasında immün işaretlenme	70
Şekil 6.4.1.	PLIN2 protein yoğunluğunun western bantları analizi	71
Şekil 6.4.2.	PLIN3 protein yoğunluğunun western bantları analizi	72
Şekil 6.5.1.	Östradiol için standart konsantrasyon eğrisi	73
Şekil 6.5.2.	Gruplar arasında serum östradiol seviyelerinin karşılaştırılması	73
Şekil 6.5.3.	Progesteron için standart konsantrasyon eğrisi	74
Şekil 6.5.4.	Gruplar arasında serum progesteron seviyelerinin karşılaştırılması	74
Şekil 6.5.5.	LH için standart konsantrasyon eğrisi	75
Şekil 6.5.6.	Gruplar arasında serum LH seviyelerinin karşılaştırılması	75

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ATP	:Adenozin Trifosfat
ATGL	:Adiposit Triglicerid Lipaz
cAMP	:Siklik Adenozin Monofosfat
CAH	:Konjenital Adrenal Hiperplazi
DAPI	:4,6-diamino-2-phenylindole
DHAP	:Dihidroksiaseton Fosfat
DHEA	:Dihidroepiandrostenedion
DHEAS	:Dehidroepiandrosteron Sülfat
DNL	:De Novo Lipogenez
E	:Embriyonal
E2	:Östradiol
ELISA	:Enzim Aracılı İmmünoresorbent Deneyi
FSH	:Folikül Uyarıcı Hormon
GDF-9	:Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
GnRH	:Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GLUT-2	:Glukoz Transporter 2
GLUT-5	:Glukoz Transporter 5
GV	:Germinal Vezikül
GVBD	:Germinal Vezikül Yıkımı
HRP	:Horse-Radish Peroksidaz
HSL	:Hormon Sensitif Lipaz
HFCS	:Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu
IGF	:İnsuline Benzer Büyüme Faktörü
IGF1	:İnsuline Benzer Büyüme Faktörü 1
IVM	:İn Vitro Maturasyon
LD	:Lipid Droplet
LH	:Lüteinleştirici Hormon
MII	:Metafaz II
mRNA	:Mesajcı Ribonükleik Asit

NBF	:Nötral Tamponlu Formalin
NIH	:Ulusal Sağlık Enstitüsü
NICHHD	:Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü
OR	:Oosit Rezervi
PBS	:Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PCO	:Polikistik Over
PCOS	:Polikistik Over Sendromu
PKA	:Protein kinaz A
PMSF	:Phenylmethyilsulfonyl Fluoride
PLIN	:Perilipin
PPAR	:Peroxisome Proliferator Activated Reseptor
RNA	: Ribonükleik Asit
SHBG	:Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
T	:Total Testosteron
TAG	:Triaçilgliserol
T-PER	:Tissue Protein Extraction Reagent
TBS	:Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu
TG	:Trigliserid
TGF-β	:Transforme Edici Büyüme Faktörü-B
TICs	:Teka İnterstisiyel Hücreleri
ZP	:Zona pellusida
17 β-HSD	:17 beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz
VLDL	:Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1.ÖZET

JUVENİL DÖNEMDE YÜKSEK FRUKTOZ İÇERİKLİ DİYETLE BESLENMENİN PERİLİPİN EKSPRESYONU ÜZERİNDEN POLİKİSTİK OVER SENDROMU GELİŞİMİ İLE İLİŞKİSİ

Polikistik over sendromu (PCOS) oluşumunda etkili olan çevresel faktörlerin başında beslenme yer almaktadır. PCOS ve yüksek fruktoz içerikli diyet birlikteliğini gösteren çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Çalışmamızda juvenil dönemde yüksek fruktoz içerikli diyet ve PCOS birlikteliği gösterilerek Perilipin2 (PLIN2) ve Perilipin3 (PLIN3) ekspresyonlarını incelemek amaçlanmıştır. Çalışmamızda 36 adet Balb/C türü dişi fare kullanılmış ve dört grup oluşturulmuştur; oral gavaj ile %20 fruktoz içeren çeşme suyu verilen High Fructose (HF)-1 grubu (n=10), oral gavaj ile %40 fruktoz içeren çeşme suyu verilen HF-2 grubu (n=10), 20 gün boyunca susam yağında çözdürülerek (0,01ml 95% etanol içerisinde çözülerek ve 0,09ml susam yağı ile karıştırılarak) subkutan DHEA (dehidroepiandrosteron, 6 mg/100g/gün) enjekte edilen Hormon (H) grubu (n=8) ve hiçbir uygulama yapılmayan Kontrol (K) grubu (n=8). Gruplar arasındaki morfolojik farklılıkları gösterebilmek için Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyaması, PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonlarını gösterebilmek için ise immunfloresan işaretleme uygulanmıştır. PLIN2 ve PLIN3 antikoru için Western Blot yöntemi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki östradiol (E2), progesteron ve Luteinizan Hormon (LH) seviyelerinin karşılaştırılması amacı ile ELISA tekniği uygulanmıştır. Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 18,0 istatistik programı ile yapılmıştır. HF-1, HF-2 ve Hormon gruplarında antral ve preantral folikül sayısının artmış olduğu ve PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonlarının Hormon ve HF-1 gruplarında yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak yüksek fruktozlu diyet ile beslenme PCOS oluşumuna katkı sağlayabilir ve bu mekanizmada PLIN2 ve PLIN3 proteinleri etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: fare, fruktoz, ovaryum, PCOS, perilipin

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No:2016/07).

2.ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN MAINTAINING DIET CONTAINING HIGH FRUCTOSE AND DEVELOPMENT OF POLYCYTIC OVARIAN SYNDROME VIA PERILIPIN EXPRESSION IN JUVENILE PERIOD

Diet comes at the first place among factors affecting PCOS development. Studies showing diet consisting of PCOS combined with high fructose are in a limited level. In this study, it is aimed to investigate PLIN2 and PLIN3 expressions by showing diet consisting of combination of high fructose and PCOS in Juvenile phase. A total of 36 Balb/C type female mice have been used and 4 groups are created: HF-1 (tap water containing 20% fructose is given by oral gavage), HF-2 (tap water containing 40% fructose is given by oral gavage), Hormone (injection of DHEA [6 mg/100g/day in 0,1 ml of sesame oil] s.c. for 20 days), Control (no treatment). Hematoxylin and eosin staining have been used in order to show the morphological differences between the groups. For PLIN2 and PLIN3 expressions immunofluorescence method has been used. For PLIN2 and PLIN3 antibodies western blot method has been used. ELISA technic has been used to compare E2, progesterone and LH levels between the groups. Statistical analysis were carried out using the statistics program SPSS 18,0. It is seen that antral and preantral follicle numbers of HF-1, HF-2 and Hormone groups have increased. It is also seen that PLIN2 and PLIN3 expressions are high in HF-1 and Hormone groups. As a result diet with high fructose could contribute to PCOS development and in this mechanism PLIN2 and PLIN3 proteins could also be effective.

Key words: fructose, mice, PCOS, perilipin, ovary

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Lipid Dropletler (LD), hücre içi sitoplazmik yapılardır ve nötral lipidleri metabolik enerji, membran bileşeni, translasyon sonrası protein modifikasyonu ve sinyal molekülü gibi birçok hücre içi olayda daha sonra kullanmak üzere, diğer organellerden ayırmakta ve trigliserid (TG) olarak depo etmektedirler (1, 2). Hücre içerisinde gerçekleşen membran yapımı, taşıma, lipid metabolizması ve biyosentez gibi birçok aşamada gerekli olan enerji TG'nin hidrolizi ile sağlanmaktadır (3).

LD, özel proteinler içeren fosfolipid tabaka ile çevrilidir (4). Bu özel proteinlerden biri olan perilipin (PLIN), LD dinamiğinde çok önemli bir role sahiptir ve 5 alt tipi bulunmaktadır; PLIN1, PLIN2, PLIN3, PLIN4 ve PLIN5 (5). PLIN, LD'in yüzeyini örtmekte ve sitozolik TG'i, hormon sensitif lipaz (HSL) tarafından hidrolizden korumaktadır. PLIN ve HSL, siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı protein kinaz A (PKA) ile fosforile edilerek aktive olmaktadır. Bu basamak, HSL regülasyonunda kilit öneme sahiptir ve lipolizin hız kısıtlayıcı basamağıdır (6).

PCOS heterojen ve kompleks endokrin rahatsızlıklardan birisidir. Kadınlardaki prevalansının % 5 ile % 10 arasında olduğu tahmin edilmektedir (7). Üreme çağındaki kadınlarda görülme sıklığı ise % 5 ile % 13,9 arasındadır (8, 9).

PCOS patofizyolojisi tam olarak ortaya konulamamış olmakla birlikte, kronik anovulasyon, hiperandrojenizm ve ultrasonografide polikistik ovaryumlar ile karakteristiktir (10-14).

Karbonhidrat ve yağ metabolizmasının önemli enzimleri olan fosfofruktokinaz ve glukoz-6- fosfat dehidrogenazın, in vitro oosit maturasyonunda kumulus oosit kompleksinde yapılan araştırmalarda seviyelerinin değişmediği bulunmuştur. Bu enzimlerin spesifik aktivitesi oositte artarken kumulus hücrelerinde azalmaktadır. Oosit maturasyonunda etkili olan bu enzimler fruktoz ve lipid metabolizmasının son derece önemli olduğunu göstermektedir (15).

Günlük diyet ile alınan fruktoz miktarının artması ile birlikte TG ve glikoz düzeyi de artmaktadır (16, 17). Yüksek fruktoz alımının sonucu olarak glikojen sentezi, de novo lipogenez ve TG sentezi gerçekleşmektedir (17, 18). Yapılan çalışmalarda % 30 fruktoz ile beslenen farelerde PLIN2 ekspresyonu up-regüle olmaktadır (19). Aşırı fruktoz alımı ile birlikte, PCOS'ta görülme sıklığı yüksek olan insulin direnci oluşmaktadır (20). Artmış insülin seviyesi ovaryumdaki steroidogenezi uyararak, teka hücreleri tarafından aşırı androjen üretilmesine neden olmaktadır (21). Overyan hiperandrojenizm, erken foliküler atreziye ve bunun sonucunda oligo-/anovulasyona neden olmaktadır (9, 22, 23).

Beslenmedeki başlıca fruktoz kaynakları; şeker kamışından elde edilen sakkaroz, yüksek fruktozlu mısır şurubu (High Fructose Corn Syrup - HFCS) olarak da bilinen Nişasta Bazlı Şeker, meyveler ve baldır. HFCS, % 55 - 90 fruktoz içermektedir ve fruktoz günlük besin alımında önemli bir kaynağı teşkil etmektedir (24). 1971'de keşfedilen HFCS, birçok ülkede gıda pazarına hızlı bir giriş yapmıştır. HFCS, 1970'li yıllarda, ABD'de tüketime sunulan tüm kalorili tatlandırıcıların % 1'ini temsil ederken, 2000'li yıllarda bu oran % 42'ye yükselmiştir. HFCS; gazlı ve meyve aromalı içecekler, çikolata, şeker ve reçel gibi birçok işlenmiş üründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Buna paralel olarak da insanların günlük tükettiği fruktoz miktarı önemli derecede artmıştır. ABD'de, günlük fruktoz tüketim miktarının çocuklarda yaklaşık 55 g ve gençlerde 73 g olduğu bildirilmektedir (25). Amerika Birleşik Devletleri'nde doğurganlık çağındaki kadınlar günlük enerji ihtiyaçlarının % 23'ünden fazlasını tatlandırılmış içeceklerden karşılamaktadırlar (26).

Daha önceki çalışmalar ile PLIN2'nin lipid yıkımını engelleyip, lipid birikimini teşvik ettiği gösterilmiştir (27). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, PLIN2 ve PLIN3'ün oosit matürasyonunda ve erken embriyo gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (28-30). Yapılan in vitro matürasyon (IVM) çalışmalarında PLIN2 ekspresyonu sabit kalırken, PLIN3 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (28-30). PLIN2 ekspresyonu IVM esnasında PLIN3 ekspresyonuna göre daha yüksek seyrederken, embriyo gelişiminin erken aşamalarında PLIN3 upregüle olup

PLIN2'den daha fazla eksprese olmaktadır. Blastokist aşamasında PLIN3'ün PLIN2'ye göre 15 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır (28).

Hipotez: Juvenil dönemde yüksek fruktoz içerikli diyet ile beslenmenin, PCOS gelişiminde etkili olabileceğini ve aynı zamanda ovaryumda PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonlarında farklılıkların oluşabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, ELISA, Western Blot ve immunfloresan yöntemlerini kullanarak, kontrol grubu, yüksek fruktoz ile beslenen fareler ve dihidroeptandostenedion uygulanan farelerde ovaryum dokusunda PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonlarını göstermeyi amaçladık.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Ovaryumlar

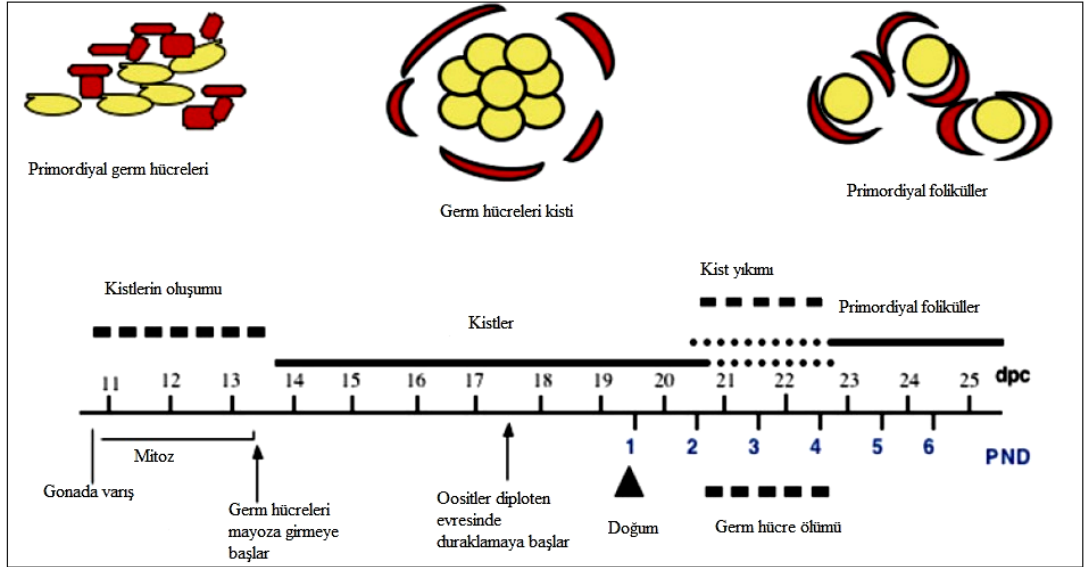
4.1.1.Ovaryum Embriyolojisi

Memeli gonadları embriyogenez sırasında ürogenital kabartı ya da genital çukıntı olarak adlandırılan bölgede gelişirler. Erken embriyonik dönemde hem erkek hem de dişi gonadlara farklılaşabilme yeteneği olduğundan, “farklılaşmamış” ya da “bipotansiyel” gonad olarak adlandırılır. Bu aşamadaki gonadlar genetik sinyale göre dişi (ovaryum) ya da erkek (testis) gonadları şeklinde gelişirler. Primordiyal germ hücreleri yolk kesesinden ürogenital kabartı bölgesine göç edip kolonize olana kadar gonadal farklılaşma meydana gelmez. Farelerde primordiyal germ hücrelerinin genital çukıntıya yerleşmesi ve farklılaşmamış gonadlarda kolonizasyonu yaklaşık embriyonal (E-) 9,5. ve 11,5. günler arasında meydana gelir (31, 32).

Primordiyal germ hücreleri kolonize olduktan sonra ovaryumda mitoz bölünmeler geçirerek kist şeklindeki yapıları oluştururlar. Bu aşamadaki germ hücreleri oogonia olarak adlandırılır (33). Farelerde mitoz yaklaşık olarak E- 13,5. günde başlar (34). Kistin büyümesi sırasında tamamlanmamış sitokinez meydana gelir ve hücreler interselüler köprüler ile bağlantıda kalır. Bu hücreler senkronize halde bölünme geçirirler (35). Sinsisyum halindeki oogonyalar kist yapılarından ayrılır, bir oosit ve etrafında birkaç somatik granüloza hücresi ile çevrili primordiyal foliküller oluşur (32).

Germ hücre sinsisyumlarının yıkılması ve primordiyal foliküllerin oluşması insanlarda doğumdan önce oluşurken, farelerde doğumdan kısa bir süre sonra oluşur (32). İnsanlardaki sinsisyumların prenatal hayatta yıkılarak, 6 milyon olan oosit sayısının doğumda 1 milyon kalması, germ hücre kaybı ile ilişkilendirilir (35-38). Doğumdaki mevcut primordiyal folikül havuzu, bütün üreme çağı boyunca mevcut olan germ hücrelerinin toplamını temsil eder (39).

Ovaryum kordlarını oluşturmak üzere germ hücreleri ve epitelyal pregranüloza hücreleri bir araya gelir (40-43). Kord dıştan bazal membran ile çevrilerek gelişen ovaryumun mezenkimal hücrelerinden ayrılır (44, 45). Kordun yıkımı ile birlikte mayozun profaz evresinde bekleyen germ hücreleri ve etrafında tek katlı yassı epitelden oluşan primordiyal foliküller meydana gelir (Şekil 4.1.1). Primordiyal foliküllerin etrafı bazal membran ve mezenşimal hücreler ile çevrilir. Primordiyal foliküllerin içerisindeki primer oositler yaklaşık olarak E- 17,5. günde mayozun diploten aşamasındadır ve ovulasyona kadar duraklama dönemine girerler (46).

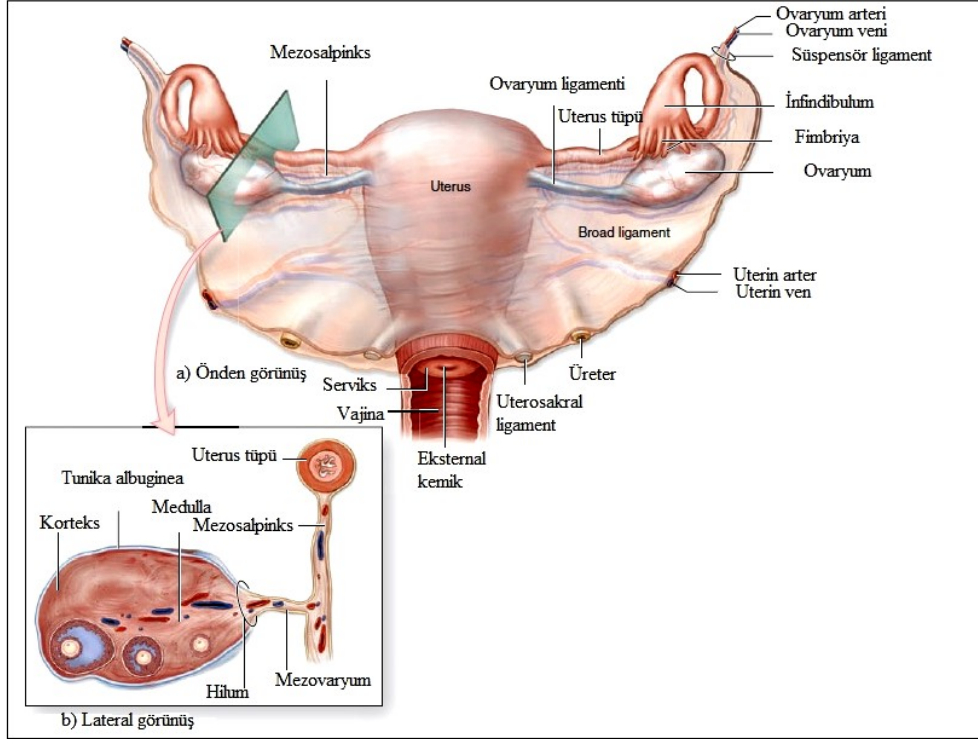


Şekil 4.1.1. Memeli dişi germ hücre gelişimi (33).

4.1.2. Ovaryum Anatomisi

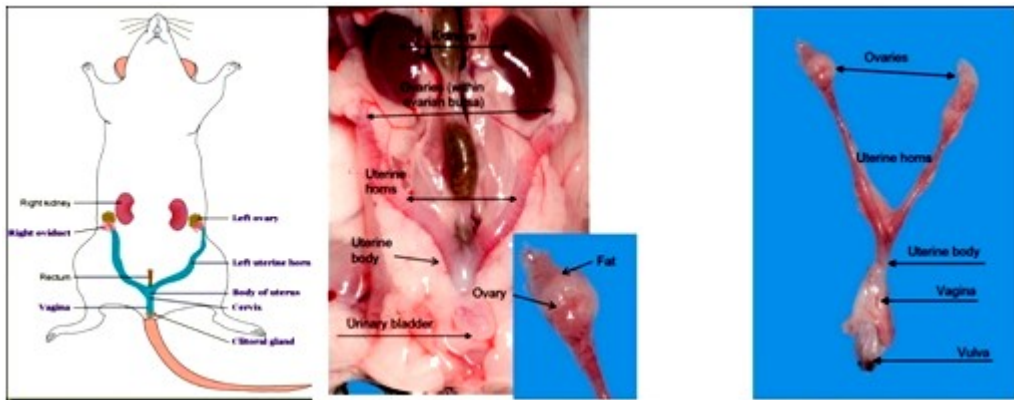
İnsanlarda sağ ve sol olmak üzere bir çift ovaryum bulunur ve intraperitoneal olarak yerleşmişlerdir. İfundibulopelvik bağ ile pelvik duvara bağlanırlar. Doğurmamış kadınlarda pelvisin dış yan duvarlarındaki fossa ovaricalarda, doğurmuş kadınlarda ise genellikle rektouterin çıkmazda, rektumun iki yanındaki "Claudius Çukuru" olarak adlandırılan bölgede konumlanırlar. Ovaryumlar bir peritoneal katlantı olan mezovaryum ile ligamentumlatum uteri'ye tutunmuşlardır (Şekil 4.1.2.1). Ovaryumu besleyen damarları içeren süspansör ligament, organın üst

ucuna kadar uzanır. Mezovaryumun iki yaprağı arasında hilum ovarii'ye ulaşan arter, ven, lenfatikler ve sinirler bulunur (47, 48).



Şekil 4.1.2.1.İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı (49).

Farelerde ovaryumlar, tüp şeklindeki uterus boynuzlarının son kısmında, fallop tüplerinin hemen üzerinde sağlı sollu olarak yerleşim göstermektedirler (Şekil 4.1.2.2).

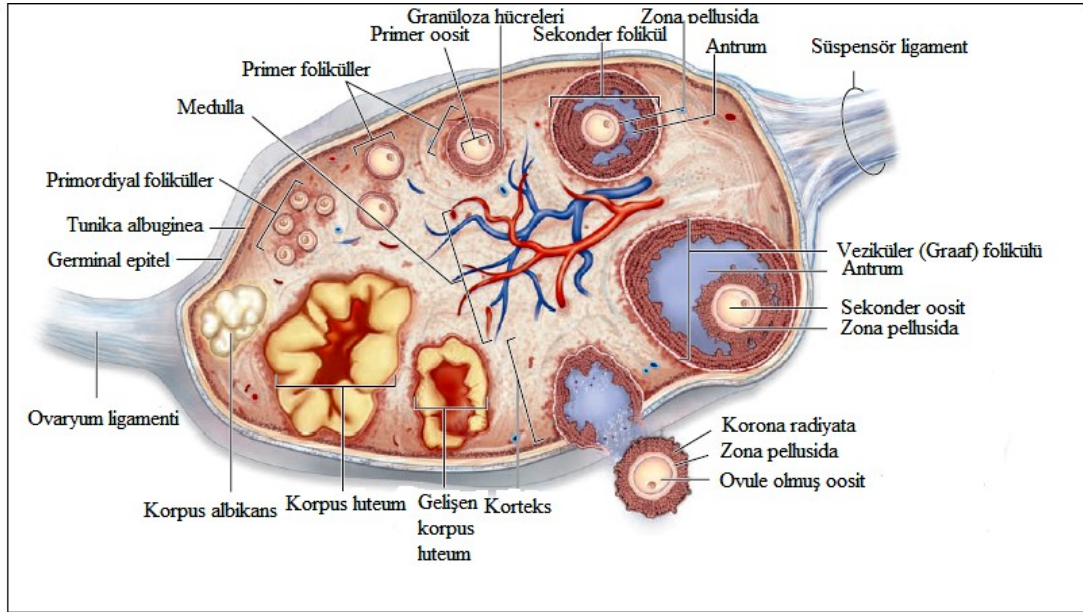


Şekil 4.1.2.2.Farede ovaryumların yerleşimi (50, 51).

4.1.3.Ovaryum Histolojisi

Memelilerde ovaryum yüzeyi tek katlı kübik ve bazı bölgelerde tek katlı yassı epitel ile örtülüdür. Germinal epitel olarak isimlendirilen epitel, visseral peritonun mezoteli ile devam eder. Germinal epitelin altında düzensiz sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır (49).

Ovaryum, korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Korteks ya da kortikal bölge, medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferik bölgesinde, tunika albuginea tabakasının altında yer almaktadır. Foliküller, korteks bölgesinde zengin bir selüler bağ dokusu içerisinde bulunmaktadırlar. Foliküllerin etrafındaki stromada dağınık düz kas lifleri bulunur. Korteks, foliküllere ek olarak korteks fibrositleri, kollajen ve retiküler lifleri içerir (52). Medulla ya da medullar bölge, ovaryumun merkezi bölgesinde bulunmaktadır ve gevşek bağ dokusu, büyük kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler içermektedir (Şekil 4.1.3). Medulladaki geniş kan damarları daha küçük damarlarla korteksin tüm bölümlerine yayılır. Medulla, ovaryumu askıya alan mezovaryum ile devam eder. Mezovaryum, ovaryumun germinal epiteli ve peritonun mezoteli ile kaplanmıştır (53).



Şekil 4.1.3.Ovaryumun histolojisi (49).

4.1.4.Foliküler Gelişim (Folikülogenez)

Fetal yaşamda meydana gelen oogonyumlar mitoz bölünme ile sayılarını arttırıp doğumda mevcut olan oosit rezervini (OR) oluştururlar. Doğumda mevcut olan primordiyal foliküllerin sayısı 600 000 ile 800 000 arasında iken, reproduktif yaşam süresince sadece 400 olgun oosit üretilir. Kadınlarda, primordiyal folikülün büyüyüp gelişmesi ve ovulasyon aşamasına gelmesi yaklaşık bir yıllık bir süreci kapsamaktadır (52).

Folikül gelişimi (folikülogenez), seçilmiş primordiyal foliküllerin büyüyüp, folikül içerisindeki yumurtanın fertilize olabilmesi için ovulasyon ile ovidukta atılması ya da atreziye uğrama potansiyeli olan grafiyan foliküllerine özelleşip gelişmesi olayıdır. Folikülogenez, ovaryumun korteks tabakasında meydana gelir (49).

Folikülogenez ardı ardına hücre çoğalması ve farklılaşmasının yüksek düzeyde organizasyonu olarak kabul edilmektedir. Dört temel gelişimsel olayı içerir:

- 1) primordiyal folikül seçilimi,
- 2) preantral folikül gelişimi,
- 3) antral folikülün gelişimi ve seçimi,
- 4) folikül atrezisi (54).

Folikülogenez iki faza ayrılabilir:

- İlk faz preantral ya da gonadotropin bağımsız faz olarak adlandırılır ve oositin büyüyüp farklılaşması ile karakterizedir.
- İkinci faz antral ya da gonadotropin bağımlı faz olarak adlandırılır ve folikül boyutunun artışı ile karakterizedir.

Preantral faz, lokal olarak üretilen büyüme faktörleri ile otokrin-parakrin mekanizma, antral faz ise folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve büyüme faktörleri ile kontrol edilmektedir. Büyüme faktörleri hücre çoğalmasını

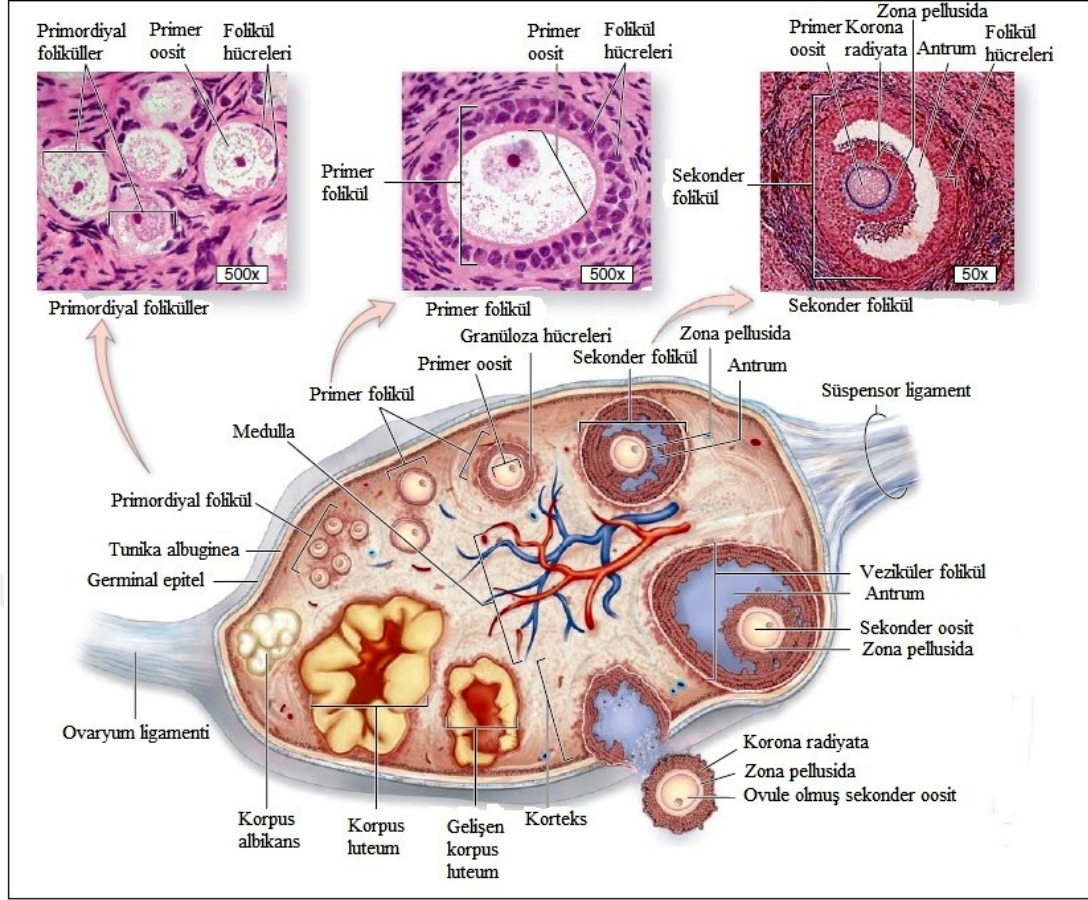
kontrol ederek gonadotropinleri modüle edebilmektedirler. Preantral faz; primordiyal, primer ve sekonder folikül aşamaları olmak üzere üç ana aşamaya ayrılmaktadır (54).

4.1.4.1.Primordiyal Folikül

Primordiyal foliküller, ovaryumlarda tüm dominant foliküllere gelişebildiklerinden, temel üreme birimleri olarak kabul edilmektedirler. Mayozun profaz aşamasında duraklamış olan primordiyal folikülün, büyüyen folikül havuzuna katılması, seçim ya da primordiyal folikül aktivasyonu olarak adlandırılır. Histolojik olarak primordiyal folikül, mayozun profaz I evresinde duraklamış olan küçük bir oosit, tek katlı yassı granüloza hücreleri ve bazal lamina'dan oluşmaktadır. Bazal lamina, granüloza hücrelerini ve oositi mikroçevrede bulunan diğer hücrelerden ayırmaktadır (54). Primordiyal folikül bağımsız kan dolaşımına sahip değildir, bundan dolayı endokrin sisteme sınırlı erişimi vardır (55).

4.1.4.2.Primordiyal Folikül Seçilimi (Primordiyal Foliküllerden Primer Foliküllere Geçiş)

Primordiyal foliküller primer foliküllere dönüşmek için, ilk büyük düzenleyici olay olan seçim geçirerek, büyüyen folikül havuzuna katılırlar. Primordiyal folikülden, primer foliküle geçiş sırasında ilk önce oosit büyümektedir. Oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri, primer folikülün granüloza tabakasını oluşturmak için çoğalırlar ve farklılaşarak kübik hücrelere dönüşürler (Şekil 4.1.4.2). Bu aşamadan sonra folikül hücreleri artık, granüloza hücreleri olarak adlandırılmaktadırlar (52, 54).



Şekil 4.1.4.2. Foliküler gelişimde primordiyal, primer ve sekonder foliküllerin morfolojik görüntüsü (49).

4.1.4.3. Primer Folikül

Primer foliküller, tek tabakalı ve çok tabakalı olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Tek tabakalı primer foliküllerde, primer oosit ve onu çevreleyen tek sıra halinde kübik granüloza hücreleri bulunur. Çok tabakalı primer foliküller ise çok katlı ve çoğalan kübik hücreler ile çevrilidir. Foliküler hücreler, kendilerini ovaryumun stromasından ayıran bir bazal lamina tarafından desteklenmektedirler. Seçilime eşlik eden hücre şekli değişikliği ve mitotik aktivite ile birlikte, kübik granüloza hücreleri FSH reseptörü ekspresse etmeye başlanmaktadır (56, 57). Seçilim ile birlikte oosit büyüyüp farklılaşmaktadır. Bu süreçte oositte RNA sentezi oldukça artmaktadır (58). Zona pellusida (ZP)'yi kodlayan gen gibi, önemli oosit genleri aktive olarak bu proteinlerin transkripsiyon ve translasyonu yapılmaktadır (59). ZP, folikül hücrelerini oositten ayırmaktadır. Folikül hücrelerinin ince sitoplazmik uzantıları ZP'yi delerek oositin mikrovillusları ile temas etmektedir (53).

4.1.4.4.Sekonder Folikül

Sekonder foliküller, sürekli bölünen folikül hücreleri ve kalınlaşan ZP ile karakterize, preantral foliküllerdir. Granüloza hücrelerindeki mitozu düzenleyen mekanizma, tam anlamıyla anlaşılmış değildir. ZP'yi oluşturan proteinler, oosit tarafından salgılanmaktadır. Oosit kaynaklı büyüme faktörlerinden, büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9)'un büyük önemi olduğu bilinmektedir (60). GDF-9 geni olmayan farelerde folikül büyümesi ve gelişmesi primer aşamada kalmaktadır, dolayısı ile dominant folikül oluşmamaktadır ve bu dişiler infertildir (61). Buna göre GDF-9, primer folikülden sekonder foliküle geçişte granüloza hücrelerinde gerçekleşen mitotik aktivitenin olması için gereklidir.

Granüloza hücrelerinin çoğalması ile birlikte folikülü çevreleyen stromal hücreler, bazal laminanın dışında bağ doku hücre kılıfı olan teka folikülünü oluşturmaktadırlar. Teka folikülü iki tabakaya farklılaşmaktadır. Bunlar laminayı çevreleyen teka interna ve teka eksterna tabakalarıdır. Teka interna vaskülarize ve kübik salgı hücrelerinden oluşmuş iç tabakadır. Teka interna hücreleri steroid üreten hücrelerin ultrastrüktürel özelliklerine ve çok sayıda LH reseptörüne sahiptir. Bu hücreler LH stimülasyonuna yanıt olarak östrojen öncülleri olan androjenleri sentezler ve salgırlar. Teka gelişimine paralel olarak birçok yeni kan damarı da oluşmaktadır. Yeni kan damarlarının oluşması, foliküllere FSH ve LH gibi hormonların ve besinlerin taşınması ve atık ve sekonder folikül salgılarının dolaşıma verilmesi açısından önemlidir (62). Sekonder foliküldeki tüm granüloza hücreleri FSH reseptörü ekspresse etmektedirler (56). Buna göre, plazmadaki FSH'ın sekonder foliküle difüzyonuna yanıt olarak granüloza hücrelerinde FSH reseptörü ekspresyonu oluşmaktadır. Stroma hücrelerinin dış katmanı ise, düz kas hücrelerinden oluşan teka eksterna tabakasına farklılaşmaktadır. Düz kas hücreleri otonom sinir sistemi tarafından uyarılmaktadır (62). Granüloza tabakası ile teka interna arasındaki bazal lamina bu iki tabaka arasında belirgin bir sınır oluşturmaktadır (52).

Preantral folikül sekonder aşamayı tamamladığında beş yapısal birim içermektedir;

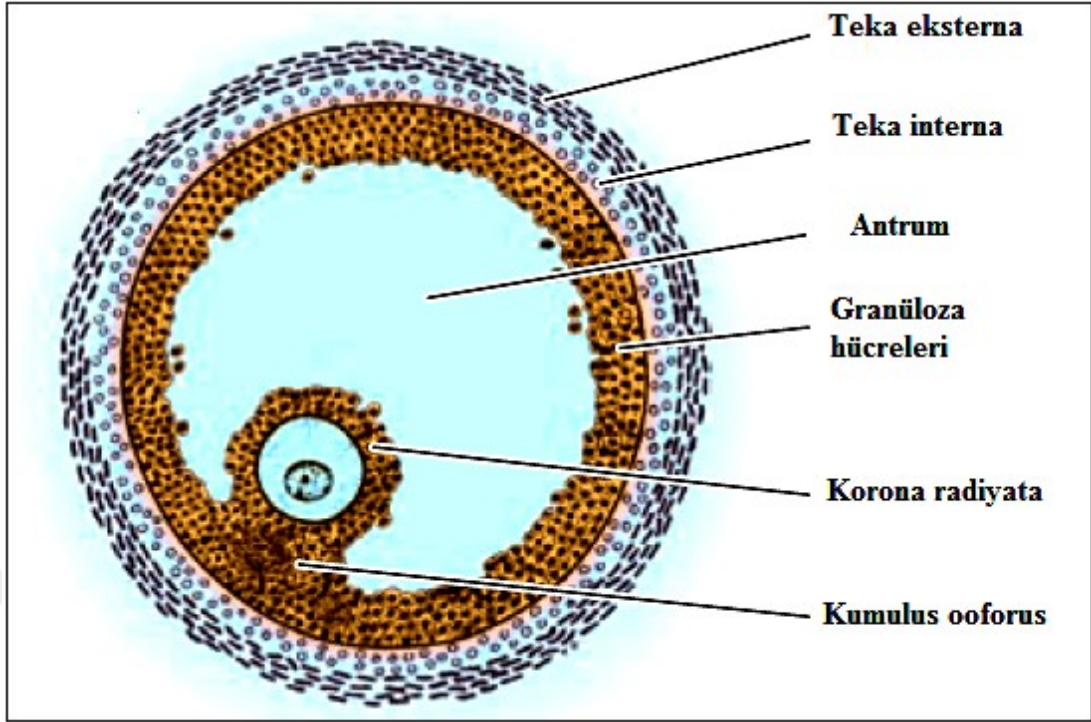
- ZP ile çevrili büyümüş bir oosit,
- 6 - 10 katlı granüloza hücre tabakası,
- bazal lamina,
- teka interna ve
- teka eksterna.

Granüloza hücrelerinin arasında boşlukların meydana gelmesi ile folikül antral aşamaya doğru ilerlemektedir. İç uyarılara cevap olarak, oositin bir kutbunda boşluk oluşmaya başlar. Antrum oluşumu olarak adlandırılan bu süreç, granüloza hücrelerinin arasında sıvı birikimi ve buna bağlı olarak iç boşluğun oluşmasıdır. Bu süreç otokrin/ parakrin mekanizmalar ile kontrol edilmektedir (53).

4.1.4.5. Antral (Graaf) Folikül

Graaf folikülleri, foliküler sıvı ile dolu bir antrum içeren karakteristik büyük foliküllerdir. Oosit ve granüloza hücrelerinin içinde bulunduğu foliküler sıvı, düzenleyici moleküller için mikroçevre oluşturmaktadır (49, 53).

Graaf folikülü, merkezde bir antrum ve onu çevreleyen farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır. Graaf folikülünün altı ayrı histolojik bileşeni vardır; teka eksterna, teka interna, bazal lamina, granüloza hücreleri, oosit ve foliküler sıvı. Granüloza hücreleri ve oosit, folikül içerisinde özel yerleşimli olarak bulunmaktadır. Bu yerleşim sonucu dört farklı granüloza hücre katmanı oluşmaktadır; en dıştaki katman membrana granüloza, en içteki katman periantral, orta alanda kalan hücreler kumulus ooforus ve oosite bitişik olarak bulunan hücreler korona radiata olarak isimlendirilmektedirler (Şekil 4.1.4.5). Membrana granüloza'nın karakteristik yapısı, bazal membrana tutunmuş yalancı çok katlı epitelten oluşan granüloza hücreleridir. Graaf folikülünde, FSH reseptörlerinin yanı sıra, LH reseptörleri de kazanılmaktadır (49, 52, 53).



Şekil 4.1.4.5.Graaf folikülü (49).

4.1.4.6.Folikül Atrezisi

Ovaryumda çok sayıda primer folikül olgunlaşma sürecine başlamaktadır. Bunların arasından sadece bir folikül gelişimini tamamlamakta, ancak seçilen foliküllerin % 99,9'u programlı hücre ölümü olan apoptoza uğramaktadır (54, 63). Foliküller, gelişimlerinin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilirler. Sağlıklı foliküllerde ekspresse olan genler hücre farklılaşması, çoğalması ve foliküler sıvı birikimini başlatırken, atretik foliküllerde ekspresse olan genler mitozun olmamasına ve apoptozun başlamasına neden olmaktadır. Atrezi sırasında oosit ve granuloza hücreleri, apoptozu başlatan genleri ekspresse etmektedirler (63). Atretik foliküller camsı membran denilen kalın kıvrılmış membranöz materyal, çok değişikliğe uğramamış zona pellusida, dejenere olmuş oosit ve folikül hücrelerinin kalıntıları ve bölgeyi istila eden makrofajlar ile ayırt edilmektedir. FSH, Graaf folikülü gelişimi için zorunludur ve apoptozu önlediği düşünülmektedir (64, 65).

4.1.5.Dominant Folikül Seçilimi

Her menstrual döngüde, tek bir dominant folikül üretilmekte ve onu tek bir ovulasyon takip etmektedir. Seçilim sırasında folikül tam olarak büyümüş bir oosite, yaklaşık bir milyon granüloza hücresine, teka internanın içermiş olduğu birkaç katman teka interstisiyel hücrelerine (TICs) ve düz kas hücrelerinden oluşan teka eksternaya sahiptir. Dominant folikülün karakteristik özelliği, granüloza hücrelerindeki yüksek mitotik aktivitedir. Orta luteal fazdan kısa bir süre sonra, tüm uygun foliküllerdeki granüloza hücrelerinde mitotik aktivite iki katına yükselmektedir. Dominant folikül mitotik aktiviteye paralel olarak, büyümesini devam ettirmektedir (64, 66-68).

Folikülün dominant hale gelebilmesi için, folikülün büyümesini uyaran FSH'nın ikinci bir pikine ihtiyaç vardır. FSH luteal fazın sonunda, progesteron seviyesinin bazal seviyeye düşmesi ile birlikte ikinci pikini yapar ve foliküler fazın ilk haftasında yüksek seyretmeye devam eder. Graaf folikülünde FSH uygun seviyeye ulaştığında, folikül dominant hale gelmektedir. Bunun fizyolojik mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Dominant folikül tarafından üretilen östradiolün, negatif geri besleme mekanizması ile FSH'nın ikinci pikini yapmasının inhibe edilmesi önemli bir noktadır (69).

4.1.5.1.Dominant Folikül Seçiliminde Otokrin ve Parakrin Mekanizmalar

Ovaryumda fertilize olabilme yeteneği olan yumurtayı içeren dominant foliküllerin üretilmesi, endokrin sisteminin kontrolü altındadır. Endokrin sistem FSH ve LH hormonları ile bu kontrolü sağlamaktadır. Gonadotropinlerin normal faaliyetlerine etki eden herhangi bir şey apopitoz ve infertilitenin oluşmasına neden olabilmektedir. Otokrin düzenlemeye göre bir hücre tarafından üretilen ligandlar (hormon, büyüme faktörleri, nötrofin ve sitokinler), yine aynı hücreye etki ederek hücrel aktiviteyi (büyüme, farklılaşma, apopitoz) düzenlemektedirler. Parakrin mekanizmaya göre ise, bir hücrede üretilen ligandlar bitişik olan hücre üzerine etki ederek hücrenin fonksiyonunu düzenlemektedirler. Beş büyük büyüme faktörü ailesi

gelişen folikülde ekspresse edilmektedir. İntrinsik büyüme faktörleri endokrin sistemle etkileşime geçerek folikülogenez, seçim, preantral folikül büyümesi, dominant folikül seçilimi, atrezi ve ovulasyon gibi fizyolojik olayların başlamasını uyarılmaktadırlar. Folikülogenez endokrin düzeyde merkezi sinir sistemi, ön hipofiz bezi ve ovaryum kaskadı mekanizması ile kontrol edilmektedir. Özelleşmiş hipotalamik nöronlar pulslar halinde, portal kan damarlarına gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılamaktadırlar. GnRH salgılanması yine pulslar halinde FSH ve LH salgılanmasını uyarılmaktadır. FSH ve LH ovaryum folikül hücrelerinde folikülogenezi kontrol etmektedir (49, 52, 54).

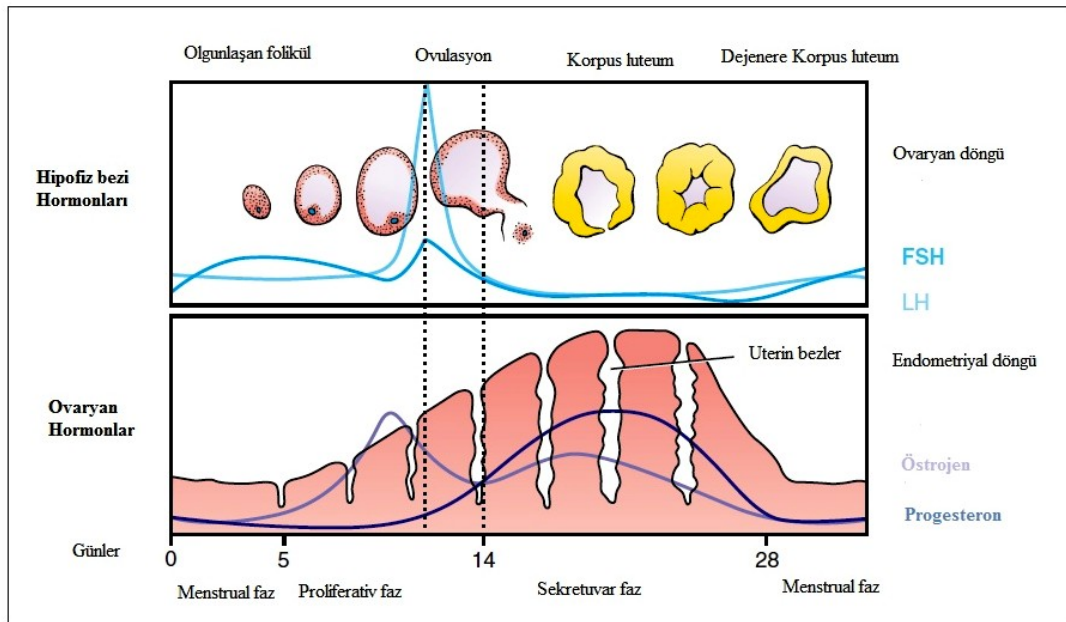
4.1.6.Ovulasyon

Ovulasyon hormonal düzenleme ile meydana gelir ve sekonder oositin Graaf folikülünden atıldığı süreçtir. Çok sayıda folikül ovaryumda büyümekte, fakat her menstrual döngüde aralarından sadece bir tanesi dominant hale gelerek ovulasyon gerçekleşmektedir. Diğer foliküller ise gerileyerek atretik hale gelmektedir (52).

4.1.6.1.Ovulasyonun Hormonal Regülasyonu

Folikülogenez sırasında hipofiz bezinden salgılanan FSH miktarı, folikül büyümesini stimüle etmek için artmaktadır. Öncelikle dominant folikül seçilmekte ve folikül büyürken E2 üretimi artmaktadır. İnsanlarda bu süreç foliküler faz olarak adlandırılmakta ve 28 günlük menstrual döngüde ilk 14 günü kapsamaktadır. Folikülde E2 üretimi arttığı zaman feed back mekanizma ile hipofiz bezini uyararak FSH salgılanmasını azaltmaktadır. FSH'ın azalması ile birlikte dominant folikül haricindeki tüm antral foliküller atretik hale gelmektedir. Menstruel siklusun foliküler fazı esnasında hipotalamustaki GnRH, hipofiz bezinden LH'ın pulslar halinde salgılanmasını kontrol ederek teka hücrelerinden androjen sentezini uyarılmaktadır. Dominant folikül büyürken üretmiş olduğu E2 miktarı da artarak, siklusun ortalarında pik yapmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte hipofiz bezi uyarılarak yüksek miktarda gonadotropin salgılanması meydana gelmektedir. FSH preovulatuvar folikülde, son morfolojik değişiklikleri uyararak kumulus ooforus hücrelerinin genişlemesine neden olmaktadır. Folikül en büyük boyutuna

ulaşmaktadır ve yumurtanın bırakılacağı yerde, ovaryum yüzeyinde çıkıntı meydana gelmektedir. Stigma olarak adlandırılan bu çıkıntının oluşması için gerekli olan enzimler, folikül tarafından üretilmektedir. FSH ve E2 granüloza hücrelerine etki ederek LH reseptörü ekspresyonunu uyarmaktadır. LH, foliküldeki steroidojenik mekanizmada değişiklikler meydana gelmesine neden olur ve bunun sonucunda androjen sentezi inhibe edilir, bu da progesteron üretimi ile sonuçlanır. LH mayozun profazında beklemekte olan oosite etki ederek ilk mayozunu tamamlamasını uyarır, böylece döllenme için hazır hale getirilir. LH stigma bölgesinin rüptüre olmasını ve kumulus hücrelerinin ve oositin folikülden ovidukta bırakılmasını (ovulasyon) uyarmaktadır. LH rüptüre olan folikülün morfolojik olarak korpus luteuma dönüşmesini ve bu yapının progesteron üretmesini uyarmaktadır (Şekil 4.1.6.1) (49, 52, 53, 70).



Şekil 4.1.6.1.FSH ve LH hormonlarının ovaryumdaki etkileri (71).

4.1.7.Oogenez

Primordiyal foliküllerdeki primer oositler, embriyonik dönemde başlamış oldukları birinci mayotik bölünmelerini ovulasyondan hemen önce tamamlamaktadırlar. Oosit folikülogenez esnasında mayoza devam etmez, bu mekanizmanın durdurulup oositin mayoza devam etmesi gerekmektedir. Bu olay

germinal vezikül yıkılımı (Germinal Vesicle Break Down [GVBD]) olarak adlandırılmaktadır. Sekonder folikül aşamasında oositin büyümesi tamamlanmaktadır. Oosit büyümesini tamamlarken meydana gelen önemli farklılaşmalardan biri mayozla devam edebilme kapasitesinin oluşmasıdır. Primer oositin kardeş hücreleri eşit miktarda kromatin içermelerine rağmen hücrelerden biri daha fazla sitoplazma alır ve sekonder oosit olarak adlandırılır. Sitoplazması az olan diğer kardeş hücre birinci polar cisim olarak isimlendirilir. İkinci mayotik bölünmeye başlayan sekonder oosit ovulasyon sonrasında metafaz evresinde duraklamaya girer. Sekonder oositin ikinci mayoz bölünmesini tamamlayabilmesi için bir spermatozoanın penetrasyonuna ihtiyaç vardır (49, 52).

Mayozun inhibisyonu için altta yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir, bununla birlikte granüloza hücrelerindeki cAMP bu inhibisyona neden olabilmektedir. Böyle bir mekanizmada FSH granüloza hücrelerinde cAMP'yi uyarmaktadır. cAMP difüzyon yolu ile oosite ulaşarak GVBD'yi inhibe etmektedir (72).

4.1.8.Korpus Luteum

Ovulasyonda geriye kalan granüloza ve teka hücreleri kollabe olarak korpus luteumu oluşturmaktadırlar. Bu olay menstrual siklusun ikinci yarısında, Luteal Faz olarak adlandırılan fazda meydana gelmektedir. Luteal fazda gonadotropin dalgasının ardından korpus luteum progesteron üretimi yaparak endometriumu gebelik için hazırlamaktadır. Döllenme olur ve embriyo uterin endometriuma implante olur ise gebelik boyunca korpus luteumun devamlılığının sağlanması için ovaryuma sinyal gönderilir. Gebelik oluşmaz ise korpus luteum gerilemekte ve progesteron üretimi durmaktadır. Gebelik için hazırlanan endometriyal astar, menstruasyon ile dökülmekte ve siklus yeniden başlamaktadır (52).

4.2. Polikistik Over Sendromu (PCOS)

PCOS ilk defa 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından tanımlanmıştır. Bu sendroma obezite, hirsudizm ve amenore eşlik etmektedir (73, 74). PCOS olan bütün kadınlar semptomların hepsine sahip değildirler. PCOS heterojen bir bozukluk olduğundan sendrom olarak adlandırılmaktadır. PCOS fazla miktarda LH salgılanması, ovaryan hiperandrojenizm, insulin direncinden kaynaklanan hiperinsulinemi ve doğurganlıktaki düşüş ile karakterize edilmektedir. PCOS anovulatuvar infertilitenin en sık nedenidir. Üreme çağındaki kadınlar arasında görülme sıklığının % 5-10 arasında olduğu tahmin edilmektedir (75).

PCOS adını ovaryumlarda meydana gelen değişikliklerden almaktadır. Polikistik overler genişlemiş ve birden fazla (10'dan fazla) immatür folikül içermektedirler. İmmatür foliküller teka hücrelerinde hiperplazi göstermektedirler ve daha az granüloza hücrelerine sahiptirler. Bu foliküllerin gelişimi dominant folikül seçiminden önce duraksamıştır. Bunun sonucu olarak LH dalgası oluşamamakta ve bu nedenle de ovulasyon gerçekleşmemektedir. Ovulasyon ile ilgili sorunlar amenore (menstruasyonun olmaması) ve oligomenore (düzensiz menstruasyon) olarak kendini göstermektedir. Hiperandrojenemi sonucu hirsutizm (vücutta kıllanmalar) ile birlikte akne oluşumu artmaktadır. Bununla birlikte PCOS ile ilişkili metabolik rahatsızlıklar da vardır. PCOS'lu kadınların çoğunda insulin direnci olduğundan tip 2 diabetes mellitus gelişme riski çok daha fazladır (76).

PCOS hastalarındaki üreme ve metabolik anormalliklerin varyasyon farklılıklarının olması, oosit gelişiminin yeterliliğinde de farklılıkların oluşmasına neden olmaktadır (77-81). PCOS'taki bozulmuş oosit yeterliliği anormal folikül gelişimi ile bağlantılıdır. Ovaryan hiperandrojenizm, insulin direnci ve hiperinsulinemi, TGF- β 'yı da içine alan büyüme faktörlerinin parakrin disregülasyonu intrafoliküler çevreyi bozarak, granüloza hücreleri ile oosit etkileşimini ve oositin sitoplazmik ve nuklear gelişimini olumsuz yönde etkilemektedirler (82-88).

1990 yılındaki PCOS Konferansı'nda Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health (NIH)) ve Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü (National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)) tanı kriterleri önermişlerdir. Bu kriterler hiperandrojenizm ve/veya hiperandrojenemi ile oligoanovulasyondur. Konjenital adrenal hiperplazi (CAH), Cushing Sendromu, tiroid disfonksiyonu, hiperprolaktinemi, androjen üreten tümörler ve ilaca bağlı androjen fazlalığı gibi endokrinopatiler hariç tutulmuştur (Tablo 4.2) (89, 90).

2003 yılında yapılan Rotterdam Konsensusu'nda üç özellikten en az ikisini kapsayacak şekilde PCOS tanı kriterlerinde değişiklik yapılmıştır; 1) klinik ya da biyokimyasal hiperandrojenizm, 2) oligo-anovulasyon, 3) polikistik ovaryumlar (PCO), daha önce tarif edilen endokrinopatiler hariç (89, 91). Yeni Rotterdam PCOS kriterleri 1990 NIH kriterleri ile tanı koyulan hastaları da içermektedir (89, 90).

Tablo 4.2.PCOS tanı kriterleri (83).

Belirti ve semptomların kombinasyonu	1990 NIH, 2003 Rotterdam ve 2006 AES PCOS kriterleri (Klasik PCOS)	2003 Rotterdam ve 2006 AES PCOS kriterleri (Ovulatuvar PCOS)	Sadece PCOS için 2003 Rotterdam kriterleri
Klinik/biyokimyasal hiperandrojenizm	Evet	Evet	Hayır
Oligoanovulasyon	Evet	Hayır	Evet
Polikistik ovaryum	Evet ya da Hayır	Evet	Evet

4.2.1.PCOS Klinik Özellikleri ve Tanısı

PCOS birçok belirti ve özelliklere sahiptir (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1.2003 Rotterdam kriterlerine göre PCOS fenotipleri (9).

	Şiddetli PCOS	Hiperandrojenizm ve kronik anovulasyon	Ovulatuvar PCOS	Hafif PCOS
Dönemler	Düzensiz	Düzensiz	Normal	Düzensiz
Ultrasonografideki ovaryumlar	Polikistik	Normal	Polikistik	Polikistik
Androjen konsantrasyonu	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Hafif Yükselmiş
İnsulin konsantrasyonu	Artmış	Artmış	Artmış	Artmış
Etkilenen kadın prevalansı	% 61	% 7	% 16	% 16

1)Hiperandrojenizm

Hiperandrojenizm, PCOS teşhisinde en sabit ve belirgin tanı kriteridir. Bununla birlikte etnik köken, vücut ağırlığı ve yaş kriterlerine göre değişiklik göstermektedir. Hiperandrojenizm klinik özelliklere, biyokimyasal değerlere veya her ikisine göre değerlendirilmektedir. Hiperandrojenizm klinik olarak hirsutizm, akne ve alopesi ile tanı almaktadır. PCOS'ta hirsutizm en yaygın görülen semptomdur ve % 60 oranında görülme sıklığına sahiptir (92-94).

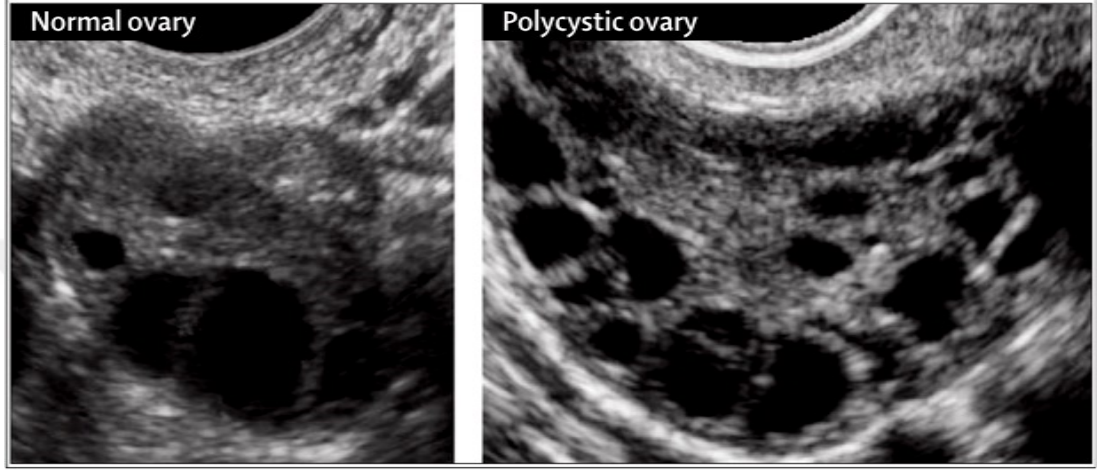
Biyokimyasal olarak hiperandrojenizm tanısı serum total testosteron (T) ve sex hormon bağlayıcı protein (sex hormone binding protein-SHBG) ölçümleri ile konulmaktadır (95-97).

2)Kronik Anovulasyon

Oligomenore teşhisi, bir yılda sekizden daha az siklusun, ya da araları 35 günden daha uzun olan siklusların varlığında konulmaktadır. Amenore ise menstruasyonun 3 aydan daha uzun bir süre olmaması ile tanımlanmaktadır (9).

3)Polikistik Ovaryumlar

Polikistik ovaryumların ultrasonografi ile teşhisi tartışmalı bir konu olmakla birlikte, 12 ya da daha fazla 2-9 mm çapında folikülün ve artmış over hacminin görülmesi PCOS tanısı koymak için yeterlidir (Resim 4.2.1) (9).



Resim 4.2.1.Normal ve Polikistik ovaryumun ultrason görüntüsü (9).

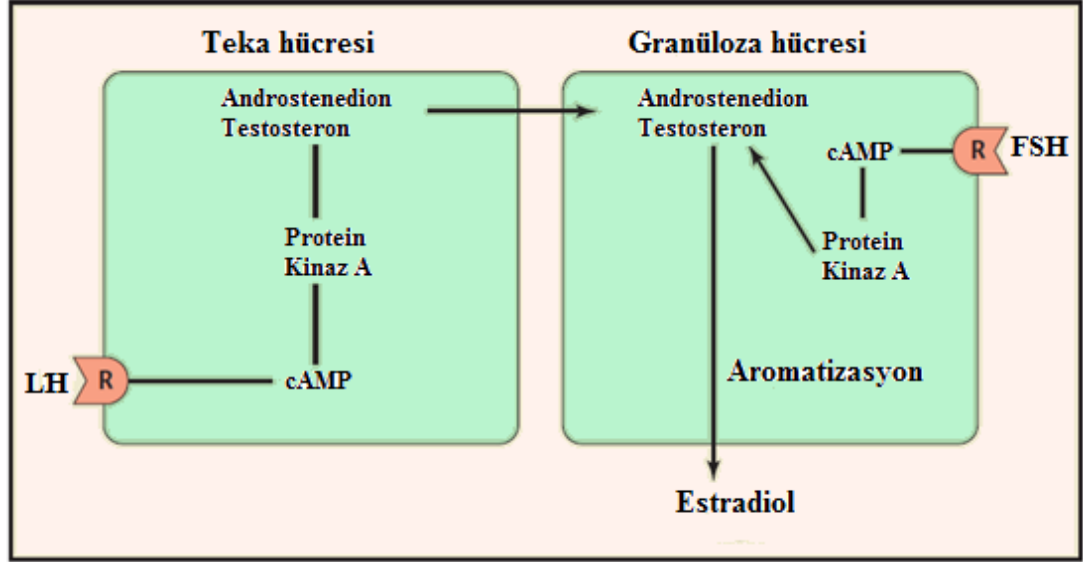
4.2.2.PCOS ve Oosit Gelişimi

Kompleks bir süreç olan folikülogenezde, endokrin ve intraovaryan parakrin etkileşimler, oosit gelişimi için intrafoliküler bir çevre oluşturulmaktadır (98). Kumulus hücreleri ve oosit arasındaki çift yönlü etkileşim, oosit gelişiminin yeterliliğinin düzenlenmesini sağlamaktadır. Oosit gelişiminin yeterliliği, mayozu tamamlayabilme, fertilize olabilme ve embriyogenezin gelişmesi olarak tanımlanmaktadır. Kısmen oositin kendisi tarafından kontrol edilen foliküler büyümenin kontrolü, PCOS'ta düzensizliğe uğramaktadır (83).

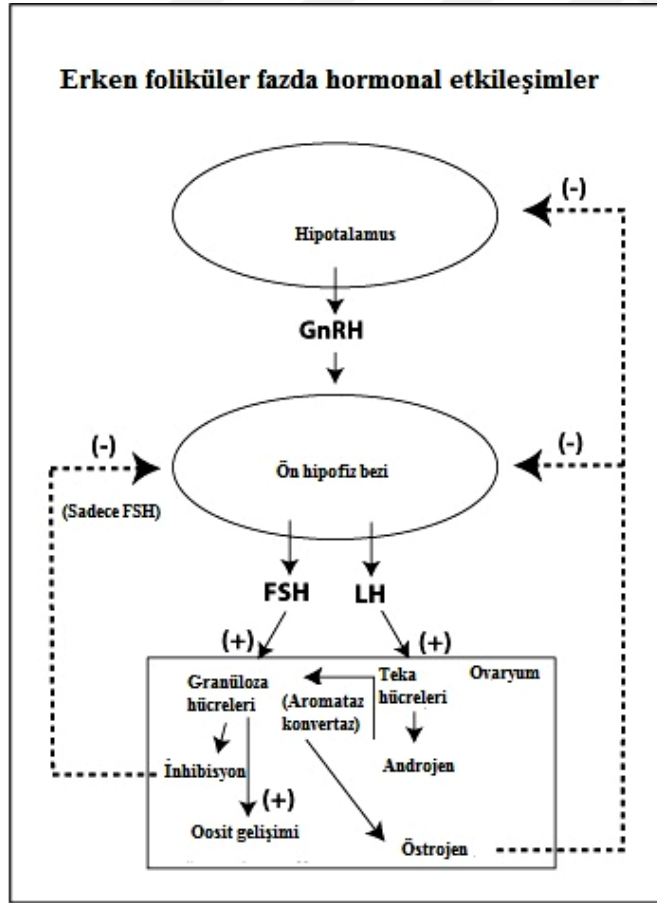
4.2.3.Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH)

Normal folikül gelişimi, östrojen ve progesteron seviyelerinin düşmesi ve korpus luteumun dejenerasyonu ile başlamaktadır. Negatif geri besleme mekanizmasının inhibisyonu, foliküllerin büyüme fazını stimüle eden FSH ve LH hormonlarının seviyelerinde küçük fakat düzenli artışı başlatmaktadır. Foliküler fazın

ilk kısmında, granüloza hücreleri sadece FSH'a yanıt verirken teka hücreleri LH'a yanıt vermektedir (Şekil 4.2.3.1 ve 4.2.3.2) (99).

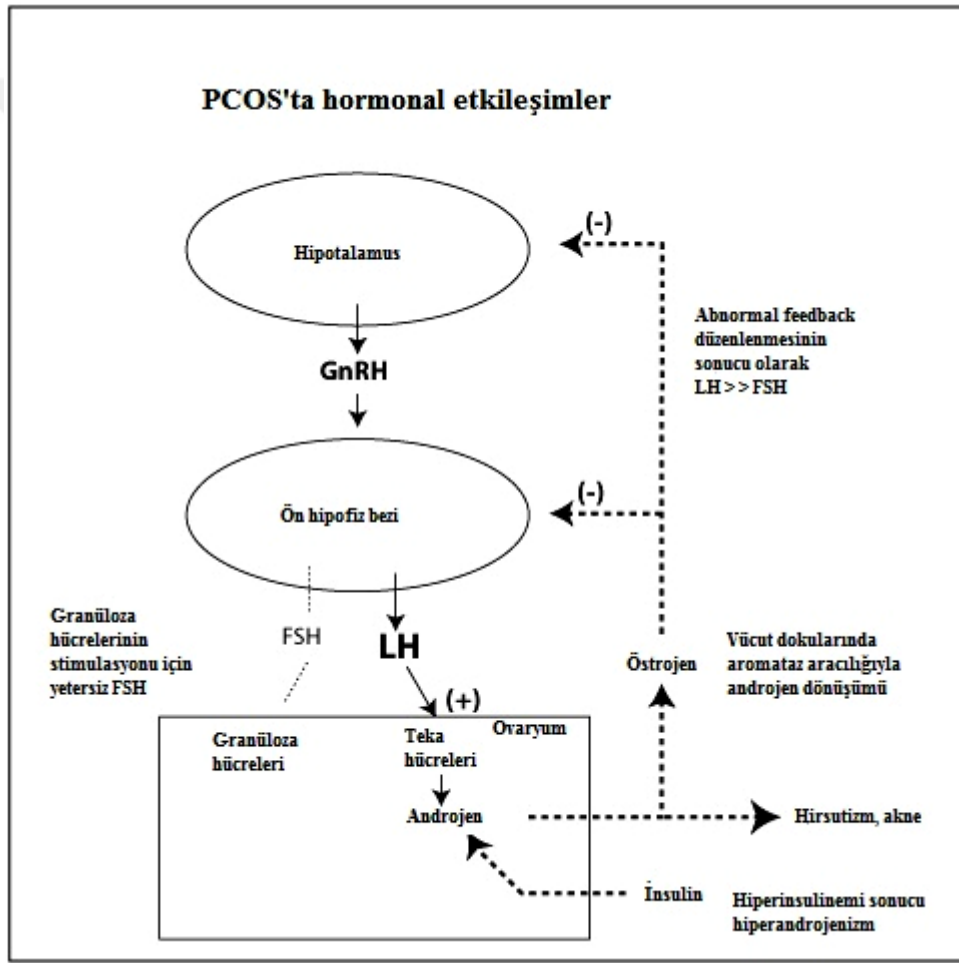


Şekil 4.2.3.1.Teka ve granüloza hücrelerindeki LH ve FSH yanıtları (100).



Şekil 4.2.3.2.Erken foliküler fazda hormonal etkileşimler (99).

PCOS'ta nedeni tam olarak belli olmamakla birlikte, gonadotropin üretiminde dengesizlikler söz konusudur. LH salgısı yükselirken, FSH salgılanması aynı kalır ya da azalır (101). LH, teka hücrelerinin proliferasyonunu ve androjen sentezini uyarmaktadır, fakat salgılanan FSH miktarı granüloza hücrelerini stimule etmek için azdır. Ovaryumda östrojen üretimi için granüloza hücrelerinden salgılanan aromataz enzimi de tam olarak ihtiyacı karşılayamamaktadır. Sonuç olarak ovaryumda fazla androjen sentezi meydana gelirken, folikül gelişiminde de başarısızlıklar söz konusudur (Şekil 4.2.3.3) (99).



Şekil 4.2.3.3. PCOS'ta hormonal etkileşimler (99).

Ovaryumda salgılanan androjenler bazı dokular (özellikle yağ doku) tarafından salgılanan aromataz yardımı ile östrojene dönüştürülür. Devamlı olarak salgılanan östrojen gonadotropin salgısının feedback mekanizmasının anormal

düzenlenmesine neden olur ve LH seviyesi FSH seviyesinden daha yüksek olmaya devam eder (99).

Bu sonuçlara göre PCOS hastalarında hipotalamus-hipofiz ekseninde bozukluk bulunmaktadır. Kortikotropin salgılatıcı faktörün artan hipofiz bezi duyarlılığını stimüle etmesi de bunun kanıtlarındandır. Bunun sonucu olarak da PCOS'lu kadınlarda fazla miktarda adrenokortikotropik hormon ve kortizol yanıtı oluşmaktadır (102). Yüksek konsantrasyondaki androjenler hipotalamusu progesteronun negatif feedback mekanizmasına karşı duyarsızlaştırmaktadırlar (103).

4.2.4.Hiperandrojenemi

PCOS olan kadınların % 60-80'i yüksek testosteron konsantrasyonuna (93, 94, 104), % 25'i de yüksek dehidroepandostenedion sülfat (DHEAS) konsantrasyonuna sahiptirler (105). Bu yüksekliklerin kontrolsüz steroidogenez sonucunda olduğu düşünülmektedir (106). Polikistik ovaryumlar kalın teka hücre katmanına sahiptirler ve bu hücreler LH stimülasyonu ile fazla miktarda androjen sentezlemektedirler (107). Bazal koşullarda serum androstenedion seviyesi antral folikül sayısını belirlemektedir (108, 109). İnsan preantral folikülleri, androjen reseptör mRNA ekspresse etmektedirler (110). PCOS hastalarındaki yüksek serum androjen seviyesi, artan 2-5 mm çapındaki foliküller ile pozitif korelasyon göstermektedir (109).

4.2.5.Hiperinsulinemi

İnsulin oosit gelişim yeterliliğinin bir başka muhtemel aracısıdır. İnsulin, foliküler seçilim ve stereogenezin stimülasyonu için teka ve granüloza hücrelerindeki ve oositteki reseptörüne bağlanmaktadır (85, 111-113). İnsulin, granüloza hücrelerinde FSH aracılı LH reseptör upregülasyonunu arttırmaktadır (114, 115).

PCOS hastalarındaki insulin duyarlılığı, anormal reseptör sonrası (post-reseptör) sinyal iletimi ile bozulmuştur (116). PCOS'taki insulin direnci sonucu

oluşan hiperinsulinemi obezitedeki ile bağımsızdır. PCOS ve obezite kombinasyonu glukoz insülin dengesini bozarak ovaryan stereogenezi teşvik etmektedir. Bunun sonucu olarak PCOS'ta insülin direnci kaynaklı hiperinsulinemiye aynı zamanda hiperandrojenizm de eşlik etmektedir. Bu olay PCOS'ta küçük antral foliküllerin granüloza hücre luteinizasyonlarına neden olmaktadır ve hücre çoğalması ve folikül büyümesi durmaktadır.

Sonuç olarak hiperinsulinemi, FSH bağımlı antral folikül büyümesini, kumulus-oosit sinyalini ve oosit gelişimini bozmaktadır (85, 114).

4.2.6.Androjen Biyogenezi

Beyinde üremeyi kontrol eden iki bölüm vardır; hipofiz bezi ve hipotalamus. Hipofiz bezi orta beyinde lokalize olan üç loblu yapı sergilemektedir. Hipofiz bezinin iki ana fonksiyonel kısmı anterior ve posterior loblardır. Hipofiz bezinin posterior lobu nöral dokudan oluşmaktadır ve hipotalamustaki nörosekretuar nöronların akson sapları ile iletişim halindedir. Beynin anterior hipofiz bezi ile iletişimi kapiller pleksus ile yapılmaktadır. Hipotalamustan nöroendokrin sinyalleri taşıyan kan damar sistemi, anterior hipofiz lobunun sapındaki endokrin doku ile direkt temas halindedir. Hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan ve ovaryum fonksiyonu için önemli olan glikoprotein yapıdaki iki hormon FSH ve LH'dır. Bunlar gonadotropik hormonlardır ve ovaryumları stimüle etmektedirler. FSH, foliküllerdeki granüloza hücrelerine etki ederek bölünme ve farklılaşmasını stimüle etmektedir (70, 117, 118).

Hem FSH hem de LH ovaryumdaki steroidogenez için gereklidir. Östrojen üretimi ovaryumda teka interstisyel ve granüloza hücrelerinde meydana gelmektedir. LH, teka interstisyel hücrelerini stimüle ederek androjen üretimlerini uyarmaktadır. FSH stimülasyonu ile de granüloza hücreleri androjenleri östrojene dönüştürmektedir. Teka hücrelerinde meydana gelen androjen üretiminde birçok enzim görevlidir. Teka hücrelerinde bu enzimlerin ekspresyonu folikülün antral aşamaya geçişi sırasında folikül gelişirken meydana gelmektedir. Bu enzimlerin

ekspresyonunu takiben teka hücreleri androjen özellikle de androstenedion üretmeye başlamaktadırlar. Androstenedionun granüloza hücrelerinde östrojene dönüşmesini sağlayan enzimlerden bir tanesi olan 17-beta-hidroksi steroid dehidrogenaz (17 β -HSD) enzimi granüloza hücrelerinde, primer folikül aşamasından Grafian folikül aşamasına kadar devamlı olarak ekspresse olmaktadır. Aynı zamanda aromataz olan bu enzimin ekspresyonu 1 mm büyüklüğündeki dominant foliküllerde FSH stimülasyonu ile gerçekleşir ve sonuçta E2 üretilmektedir. Böylece dominant foliküllerin büyümesi ile steroid üretiminde de artış meydana gelmektedir (70, 117-119).

4.3.Fruktoz

Fruktoz, birçok meyve ve sebze de bulunun bir monosakkarittir. Fruktoz ve glukoz aynı kimyasal formüle sahip olduğu halde yapıları farklıdır. Bir heksoz olan fruktozun kimyasal formülü C₆H₁₂O₆'dır. Karbon iskeletinin 1. pozisyonunda aldehit grubu içeren glukozdan farklı olarak, fruktoz 2. karbonunda bir keto grubu içermektedir. Çözelti içerisinde α ya da β - piranoz ya da furanoz halkası olarak bulunmaktadır. Fruktoz ve glukoz meyve ve balda da az miktarda bulunan monosakkaritlerdir. Sofra şekeri olarak bilinen sukroz bir molekül glukozun bir molekül fruktoz ile α 1-4 glikozid bağları ile oluşturmuş olduğu bir disakkarittir (120). Saf ve kuru haldeki fruktoz, oldukça tatlı, beyaz, kokusuz, kristal bir katıdır ve tüm şekerler içinde suda çözünürlüğü en fazla olanıdır (121). Özellikle tatlılık ve çözünürlük özelliğinden dolayı tatlandırıcı olarak kullanımı sıktır. Fruktoz, ticari olarak tatlandırıcı amaçla mısır şurubu adıyla kullanılmaktadır. Tatlıların hazırlanmasında, karbonatlı içeceklerde, hazır yiyeceklerde, bisküvilerde, hazır şekerli gıdalarda ve şekerlemeler içinde bulunmaktadır, ayrıca pastacılıkta sıkça kullanılır (122). Glikojen sentezi, de novo lipogenez (DNL) ve triaçil gliserol (TAG) sentezi yüksek fruktoz alımının sonuçları olarak karşımıza çıkmaktadır (17).

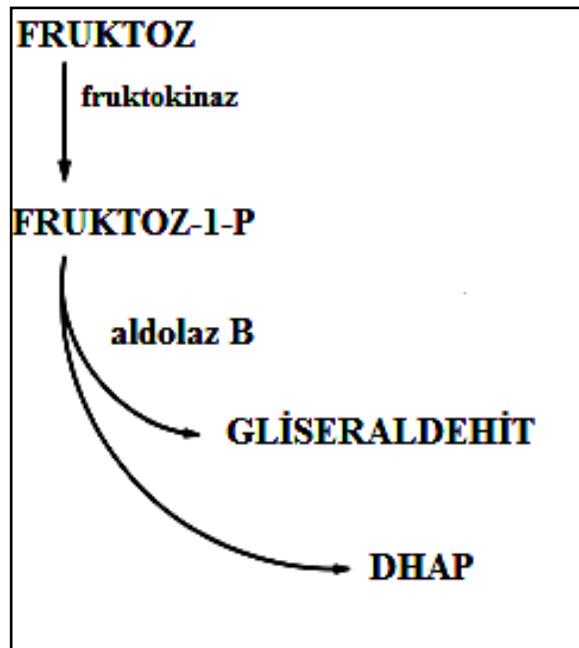
4.3.1.Fruktozun Emilimi, Taşınması ve Hücreye Girişi

Fruktoz emilimi ince bağırsakta olmakla birlikte tam olarak aydınlatılmış değildir (123). Fruktoz kolaylaştırılmış difüzyon ile emilmektedir (124). Fruktoz emilimi bilinen iki spesifik transporter ile meydana gelmektedir; Glukoz transporter (GLUT) -2 ve GLUT -5, fruktozun hücre içine girişinden sorumludur (120, 123, 125).

Fruktoz jejunumda absorbe edilmektedir ve portal dolaşım ile karaciğere taşınmaktadır. GLUT-2 taşıyıcıları ile fruktoz hepatositlere taşınmakta ve metabolize edilmektedir (125).

4.3.2.Fruktozun Hücre İçi Metabolizması

Fruktoz karaciğer, böbrek ve adipositlerde metabolize edilmektedir (126). Hücre içerisindeki fruktoz, fruktokinaz enzimi ile fruktoz-1-fosfata dönüştürülmektedir. Fruktoz-1-fosfat, aldolaz B ile dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehite parçalanmaktadır ve daha sonra bu ürünler glikolitik yol ile metabolize olmaktadır (124-127) (Şekil 4.3.2).



Şekil 4.3.2.Fruktoz metabolizması (17).

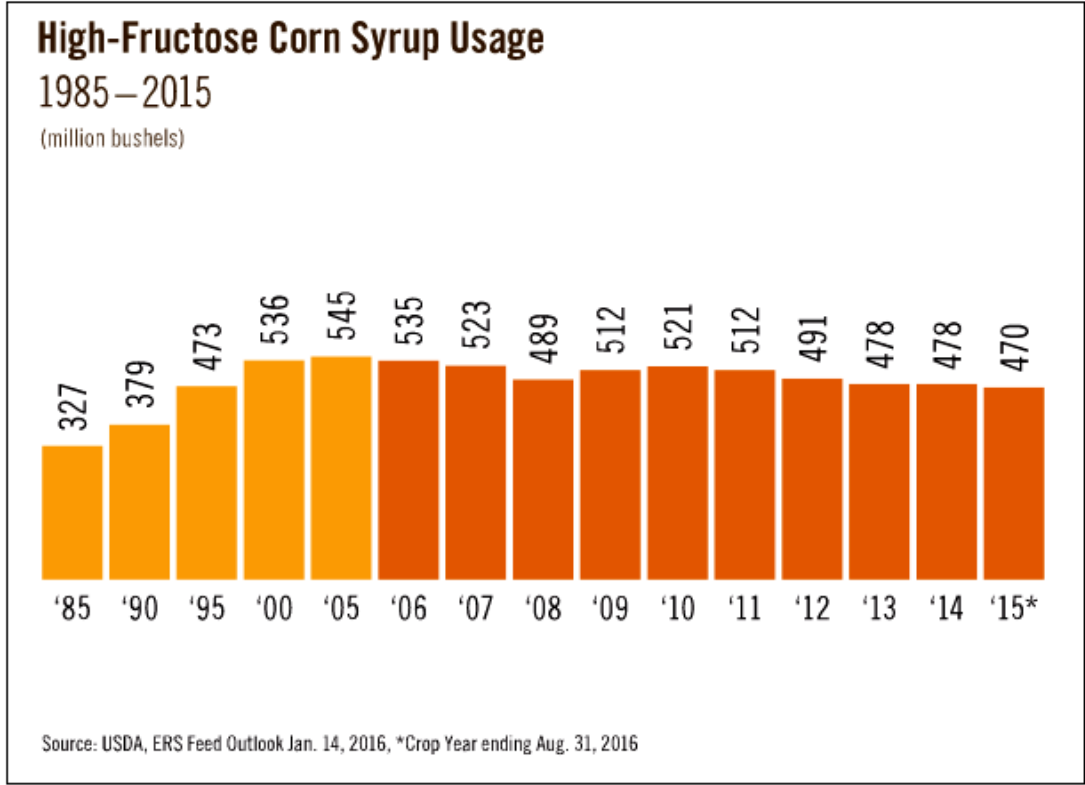
4.3.3.Fruktoz ve Enerji Metabolizması

Diğer şekerlerden farklı olarak fruktoz ani ATP deplesyonlarına yol açmaktadır. Fruktozun fosforilasyonu etkili bir şekilde regüle edilememektedir (128). Fruktoz hücre içerisine girdikten sonra fruktokinaz üzerinde etkili bir feedback mekanizması bulunmamaktadır, dolayısı ile ATP kontrolsüz olarak tüketilmektedir (124, 125, 127, 129, 130).

4.3.4.Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (High Fructose Corn Syrup-HFCS)

Meyve şekeri olarak da adlandırılan fruktozun beslenmedeki başlıca kaynakları; şeker kamışından elde edilen sakkaroz, HFCS olarak da bilinen Nişasta Bazlı Şeker, meyveler ve baldır. HFCS, % 55 - 90 fruktoz içermektedir ve fruktoz günlük besin alımında önemli bir kaynağını teşkil etmektedir (24).

1971'de keşfedilen HFCS, birçok ülkede gıda pazarına hızlı bir giriş yapmıştır. HFCS, 1970'li yıllarda, ABD'de tüketime sunulan tüm kalorili tatlandırıcıların % 1'ini temsil ederken, 2000'li yıllarda bu oran % 42'ye yükselmiştir (Şekil 4.3.4). HFCS; gazlı ve meyve aromalı içecekler, çikolata, kek, şekerleme, reçel, marmelat ve jöle gibi birçok işlenmiş üründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Buna paralel olarak da insanların günlük tükettiği fruktoz miktarı önemli derecede artmıştır. ABD'de, günlük fruktoz tüketim miktarının çocuklarda yaklaşık 55 g ve gençlerde 73 g olduğu bildirilmektedir (25). ABD'de doğurganlık çağındaki kadınlar ise günlük enerji ihtiyaçlarının % 23'ünden fazlasını tatlandırılmış içeceklerden karşılamaktadırlar (26).



Şekil 4.3.4.1985-2015 yılları arasında HFCS kullanım oranları (131).

4.4.Yağ Damlacıkları ve Hücrel Lipid Metabolizması

Yağ damlacıkları hücre içi yağ esterleri depolarıdır. Mantar, bitki, böcek ve memeli hayvanlar yağ damlacıklarını daha sonra kullanmak üzere hücre içerisinde depo etmektedirler. Metabolik enerji olarak yağ damlacıkları kullanılmaktadır (2). Lipid damlacıkları, üzerinde özel proteinler bulunan tek fosfolipid tabaka ile çevrilidirler ve merkezinde bir nötral lipid çekirdeği bulundurmaktadırlar. Yağ damlacıklarına bağlı olan bu proteinler lipid metabolizması ve transportu, hücre içi transport, sinyalizasyon, şaperon, RNA metabolizması ve hücre iskeleti organizasyonunda görevlidirler (132-137).

4.5.PAT Protein Ailesi

PAT protein ailesi evrimsel süreç içerisinde korunmuştur (138) ve 5 üyeden oluşmaktadır: PLIN1 (perilipin), PLIN2 (adipose differentiation-related protein - ADRP), PLIN3 (tail-interacting protein 47 kiloDalton - TIP47), PLIN4 (S3-12) ve

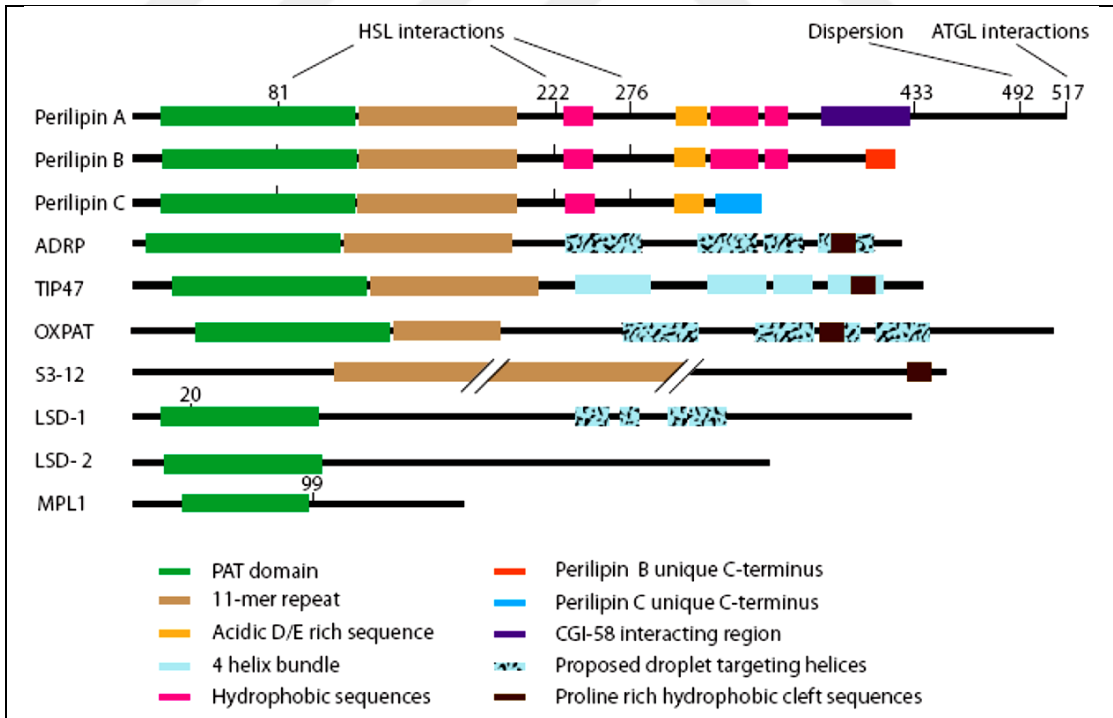
PLIN5 (OXPAT) (27). PLIN1; beyaz adipoz dokuda yüksek oranda eksprese olurken, PLIN2 makrofaj, mikroglia, granülosa hücreleri ve oositlerde eksprese olmaktadır. PLIN3, oositler de dahil birçok hücrede eksprese olurken, PLIN4'ün kahverengi yağ dokusunda daha fazla eksprese olduğu gözlenmiştir. PLIN5 ise kalp, karaciğer ve iskelet kası gibi oksidatif dokularda eksprese olmaktadır (6).

Lipid damlacığı proteini olan perilipin'in fosforile olarak TAG'ın yağ hücrelerinden yıkımı için gerekli olan sinyalin iletiminden sorumlu olduğu 1991 yılında bulunmuştur (139-141). 1997 yılında PLIN2'nin varlığı ortaya konmuştur (142). İlk üç protein olan perilipin, ADRP ve TIP47, bulunmalarının ardından PAT protein ailesi olarak isimlendirilmişlerdir (138). Aile üyeleri büyüklük, doku, yağ damlası affinitesi, serbest haldeki stabilitesi ve transkripsiyonel düzenlemeye göre farklılık göstermektedirler. Bu farklılıklar her PAT proteininin belirgin hücre fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir. Buna göre tüm PAT proteinleri yağ damlacıkları ve hücre ortamındaki regülasyonu sağlamaktadırlar (27).

PAT protein ailesi dünyada birçok farklı laboratuvar tarafından bağımsız olarak belirlenmiştir. Buna göre her PAT proteini farklı şekillerde isimlendirilmiştir (Tablo 4.5) (27). Bununla birlikte PAT proteinleri ortak yapısal özelliklere ve hücre içi yağ damlacıklarına bağlanma yeteneğine sahiptirler (Şekil 4.5). Proteinlerin yağ damlacığına tutunması yağ damlacığının içine ya da dışına yağ akımı gibi metabolik uyarılara tepki olarak gerçekleşmektedir. Yağ damlacığının yüzeyine konumlanmış olan PAT proteinleri, lipazların yağ damlacığındaki yağ esterlerine erişimini engellemektedirler ve yağ damlacığı biyogenezi için önemli hücre mekanizmaları ile etkileşime geçmektedirler (27).

Tablo 4.5.PAT proteinlerinin isimlendirilmesi.

Perilipin	Peri, PLIN, PLIN1, PLIN A, B ve C
ADRP (adipose differentiation related protein)	Adipophilin, ADPH, ADFP, PLIN2
TIP47 (tail-interacting protein, 47 kD)	Cargo selection protein TIP47, Mannose-6-phosphate receptor binding protein 1, placental protein 17 (PP17), PLIN3
S3-12	Plasma membrane associated protein, S3-12; K1AA1881, PLIN4
OXPAT	Myocardial lipid droplet protein (MLDP), lipid storage droplet protein 5 (LSDP5), PAT-1, PLIN5



Şekil 4.5.PAT protein ailesi üyeleri yapısal özellikleri (27).

4.5.1.Perilipin 2

PLIN2 (ADRP - Adipophilin) 50 kiloDaltonluk bir proteindir (27). PLIN2 ilk defa kültüre edilmiş adipositlerin farklılaşmasının indüklenmesi ile RNA transkripti olarak identifiye edilmiştir (143, 144). PLIN2 birçok hücrede küçük LD'de bulunmaktadır (142).

4.5.1.1.Perilipin 2 ve Adipogenez

PLIN2 mRNA'nın aksine, adiposit farklılaşması ilerledikçe PLIN1 mRNA ve protein seviyesi yükselmektedir. Küçük adipositler PLIN2 proteinine sahipken, daha büyük adipositlerde PLIN1 proteini bulunmaktadır. PLIN2 serbest halde stabil değildir ve ubiquitin/proteosome yolu üzerinden degrade olmaktadır (145, 146). Hem PLIN1 hem de PLIN2 genellikle LD oluşturan proteinler gibi davranmaktadırlar, fakat adipositlerdeki LD'lerde PLIN1'in görünmesi PLIN2'yi gerektirmektedir. PLIN1 kısıtlı dokularda görülürken, PLIN2 lipid biriktiren birçok dokuda görülmektedir (147).

4.5.1.2.PLIN1 null farelerde PLIN2

PLIN1 olmayan farelerde PLIN2 adipositlerdeki LD'lerde PLIN1'in yerini almaktadır (148). Bununla birlikte lipoliz regülasyonunda PLIN1 kadar fonksiyonel olamamaktadır (148, 149). PLIN2 LD'leri lipazların etkisinden PLIN1 gibi koruyamamaktadır (150).

4.5.1.3.Hücrel lipid metabolizmasında PLIN2'nin fonksiyonu

PLIN2'nin hücrel lipid metabolizmasındaki fonksiyonu hakkında birçok farklı sonucun olması yanısıra, ağırlıklı düşünce lipazların nötral lipidlere erişimini kısıtlayarak nötral lipid birikimine katkı sağladığı yönündedir. PLIN2'nin nötral lipidlere lipazların etkisinden hangi mekanizma ile koruduğu tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. PLIN2'nin aşırı ekspresyonu LD havuzunun artışı ve artmış hücrel

TG ile ilişkilidir. PLIN2'nin hücrel TAG ve LD üzerindeki etkisi TAG katabolizmasını yavaşlatarak olmaktadır (27). PLIN2'nin TAG hidrolizini azaltmadaki mekanizması, başlıca TAG lipazı olan adiposit trigliserid lipaz (ATGL)'in LD üzerine lokalizasyonunu azaltarak olmaktadır (151). PLIN2 ekspresyonu aynı zamanda bir başka PAT proteini olan PLIN3'ün azalmış LD bağlantısı ile de ilişkilidir. PLIN2'nin amino terminal yarısı eksojen oleat yokluğunda LD üzerine bağlandığında fosfolipid tabakasındaki diğer fosfolipidleri uzaklaştırmaktadır, bu şekilde PLIN3 serbest kalmaktadır (151, 152).

4.5.1.4.PLIN2 null fare modelleri

PLIN2 eksik fareler adiposit ve adipoz doku farklılaşması ve fonksiyonunu, adiposit belirteci ekspresyonunu, adipoz TAG'ı, beyaz ve kahverengi yağ dokusunu ve bazal lipoliz ve katekolamin stimule lipolizi normal olarak sergilemektedirler. Fareler aynı zamanda normal plazma lipid, glukoz ve insulin seviyesine sahiptir (27).

4.5.1.5.PLIN2 ve lipoprotein metabolizması

PLIN2'nin artışı TAG'ın LD'lerde depo edilmesine ve TAG'ın düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) olarak salgılanmasının azaltılmasına neden olmaktadır (153). PLIN2'nin siRNA ile susturulması LD'lerin azalmasına ve yağ asidi oksidasyonu artışına neden olmaktadır. Bununla birlikte PLIN2'nin eksikliğinde PLIN3 mRNA ve proteinin yüksek bulunması, PLIN2 eksikliğinin PLIN3 ile telafi edildiğini göstermektedir (154). PLIN2 eksikliğinin etkisi hücre ve dokuya göre farklılıklar göstermektedir (27).

4.5.1.6.PLIN2 ekspresyon ve fonksiyonunun regülasyonu

PLIN2 gen ekspresyonu peroxisome proliferatör-aktive reseptör (PPAR) alt ailesinin nüklear hormon reseptörleri ile düzenlenmektedir (155, 156). PPAR reseptör ligandları, uzun zincirli yağ asitleri, PPAR agonistleri ve siklooksijenaz inhibitörleri de dahil olmak üzere PLIN2 mRNA'yı indüklemektedir, fakat bu etkiler

hücre tipleri ve türler arasında değişiklik göstermektedir (157-159). PLIN2 geninin uzun zincirli yağ asitlerinin transkripsiyonal aktivasyonu ile artan PLIN2 nötral lipid sentezinin son reaksiyon ürünlerini ayırmak için bir hazne sağlamaktadır (27).

PLIN2 aynı zamanda süt lipid membranının komponentidir ve açılasyon ile modifiye olmaktadır (160). LD'ye bağlı olmayan PLIN2 kovalent olarak ubiquitin ile modifiye olmaktadır ve proteozomal degradasyona uğramaktadır (145).

4.5.2.Perilipin 3

PLIN3 (TIP47) 47 kiloDalton'luk bir proteindir ve amino terminal ucunun PLIN1 ve PLIN2'ye benzerliği ile tanımlanmıştır (147, 161). PLIN3, PLIN2 gibi PPAR ile regüle edilmemektedir (162). PLIN2 ve PLIN3 % 43 oranında benzerdirler (147, 161). PLIN2'nin aksine PLIN3 sitoplazmada stabil haldedir (27). PLIN3 mannoz-6 fosfat reseptörünün sitoplazmik kuyruk ucuna doğrudan bağlanarak endozomal kompartmandan trans-Golgi ağına transportuna aracılık etmektedir (163). PLIN2 ve PLIN3'ün aynı anda knockdown edilmesi daha az sayıda, fakat daha büyük LD'lerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu proteinlerin aynı anda knockout edilmesi ise lipolizin artmasına neden olmaktadır. Lipid metabolizması üzerindeki bu etkiler sonucunda insulin sinyal yolağının birçok aşamasında da değişiklikler meydana getirmektedir. PAT proteinlerinin ekspresyonu lipazların lipid esterlerine erişimini kontrol ederek hücrel lipid metabolizmasını ve ikinci olarak da insulin sinyalini etkilemektedir. İnsulin duyarlılığında azalma meydana gelmekte ve insulin direnci oluşmaktadır (27).

4.5.2.1.PLIN3'ün yapısı

PLIN3'ün yapısı dört sarmal domainden ve aralarında hidrofobik bağ bulunan α/β domainden oluşmaktadır. Hidrofobik bağ küçük moleküllerin bağlanması için bağlanma cebi oluşturabilmektedir. Alanin mutagenezi ile bu bağın bozulması sonucu bazı PLIN3 mutantları oluşabilmektedir. Bu mutantlar oleat yokluğunda bile LD'e lokalize olabilmektedirler (27). PLIN3'ün dört sarmal yapısı apoE'nin amino

terminal yapısı ile benzerdir. Bu benzerlik, geri dönüşümlü olarak lipoprotein ve LD'lere bağlanmadaki ortak mekanizmanın varlığını göstermektedir (164, 165).



5.GEREÇ VE YÖNTEM

Histolojik Takipte Kullanılan Malzemeler:

- **Gill's Hematoksileni:** Gill's Hematoxylene (#2311; Bio-Optica)
- **Eozin:** Eosin Y (#5114; Bio-Optica)
- **Kapatma Solüsyonu:** Bio mount solution (#1611; Bio-Optica)
- **Toluen:** Toluen (#SZBB1330V; Sigma)
- **% 100 Etil Alkol:** Etanol Absollu (#280815186001; Tekkim)
- **% 96 Etil Alkol:** Etil Alkol (#CAS64175; Alkomed)
- **Histosec Pastilles:** Boncuk Parafin (#K93442509; Merck)

Gözlem:

- **Kullanılan Mikroskop:** Nikon (ECLİPSE Ni)

İmmunfloresan Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar:

- **Fruktoz:** D-Fruktoz (#030M02261V; Sigma)
- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz Solüsyonu):**

-21,6 gr Na₂HPO₄-dibazik (Sigma)

-2 gr KH₂P0₄-monobazik (Sigma)

-80 gr NaCl (Sigma)

-2 gr KCl (Sigma)

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre distile su içerisinde çözüldü ve pH=7,4 olacak şekilde ayarlandı.

- **10X Citrate Buffer:** (#15-M103; Bio-Optica)

1 ml 10 X Citrat solüsyonu 9 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu:** % 10 Normal Keçi Serumı

100 µl normal keçi serumu (vector), 900µl % 0,3 Triton-X içeren PBS içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **Kapatma Solüsyonu:** DAPI'li kapatma solüsyonu (#P36931; Lifetechnologies)

Gözlem:

- **Kullanılan Mikroskop:** Zeiss LSM 780 NLO Multifoton ve Konfokal Mikroskop

İmmunfloresanda kullanılan primer ve sekonder antikorlar:

- **Perilipin-2/ADFP Primer Antibody** (Novusbio#NB110-40877)
- **Mouse TIP47/PP17/PLIN3** (PROGEN# GP36)
- **Goat pAb to Rb Ig G (Alexa Flour 488)** (Abcam#ab150077)
- **Goat pAb Gpig Ig G (Alexa Fluor 594)** (Abcam#ab150188)

Western Blot Analizinde Kullanılan Solüsyonlar:

- **10X Yürütme Tamponu (BioRad#161-0732)**
- **1X Yürütme Tamponu:**

100 ml 10X yürütme tamponundan 900 ml distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):**

5 gr süt tozu (Santa Cruz#sc-2325) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4 °C'de saklandı.

- **10X TBS-T Tamponu:**

-24,2 gr Tris base (Sigma#1503)

-80 gr NaCl (Sigma-Aldrich#31434)

-10 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich#P1379)

900 ml distile su ile çözüldü ve pH: 7,6'ya ayarlandı, distile su ile 1 litreye tamamlandı.

- **TBS-T Solüsyonu:**

Distile su ile 10X'ten 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı ve oda ısısında saklandı.

- **5X Transfer Solüsyonu (BioRad#170-4272)**

- **1X Transfer Tamponu:**

200 ml 5X Transfer Buffer 600 ml distile su içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml Ethanol (Merck, Millipore#K45956083438) eklendi.

- AnykD Mini-Protean TGX Precast Protein Gels (BioRad# 456-9036)
- Enhanced Chemiluminiscent Solüsyonu (Clarity Western ECL- BioRad # 170-5060)
- Trans-Blot Turbo Mini-size PVDF Membran (BioRad# 170-4272)

Western blot analizine kullanılan primer ve sekonder antikorlar:

- Perilipin-2/ADFP Primer Antibody (Novusbio#NB110-40877)
- Mouse TIP47/PP17/PLIN3 (PROGEN #GP36)
- Rb mAb to β actin (Abcam #ab52614)
- Goat anti guinea pig IgG-HRP (SANTA CRUZ #sc-2438)
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (SANTA CRUZ #sc- 2004)

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- Estradiol ELISA kiti (#E-EL0065, Elabscience)
- Progesteron ELISA kiti (#E-EL-M0944, Elabscience)
- LH ELISA kiti (#E-EL-M0057, Elabscience)
- SpectraMax İ3 Spektrofotometre

Estradiol kit içeriği:

- Sekonder antikor ile kaplı 96 kuyucuklu test kabı
- Anti E2 antikor
- Enzim konjuge solüsyon
- TMB renk ajanı
- Durdurma solüsyonu
- 20X yıkama solüsyonu
- Örnek dilüsyon solüsyonu
- E2 standartları seti: 0, 40, 120, 350, 700, 1400 pg/ml

Progesteron kit içeriği:

- Progesteron antikotu kaplı 96 kuyucuklu test kabı
- Enzim konjuge solüsyon
- Örneđ/standart dilüsyon solüsyonu
- Konsantre Biotinlenmiş antikor
- Biotinlenmiş antikor dilüsyon solüsyonu
- Konsantre HRP konjugatı
- HRP konjugat dilüenti
- Substrat solüyonu
- Durdurma solüsyonu
- 25X yıkama solüsyonu
- Progesteron standart: 10 ng/ml

LH kit içeriği:

- LH antikoru kaplı 96 kuyucuklu test kabı
- Enzim konjuge solüsyon
- Örneđ/standart dilüsyon solüsyonu
- Konsantre Biotinlenmiş antikor
- Biotinlenmiş antikor dilüsyon solüsyonu
- Konsantre HRP konjugatı
- HRP konjugat dilüenti
- Substrat solüsyonu
- Durdurma solüsyonu
- 25X yıkama solüsyonu
- LH standart: 30 ng/ml

5.1.Deney Hayvanları ve Deney Planı

İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP-Proje No: 2016/07) ve Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) tarafından desteklenen çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kutulu (İMÜ-HADYEK) (EK Sayı: 38828770-604,01,01- E,2562, 30/09/2015 Karar No:76) tarafından belirlenmiş olan deney hayvanları bakım, kullanım ve ötenazi protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden elde edilen toplam 36 adet 28 günlük ve 8 adet 92 günlük Balb/C cinsi dişi fareler kullanılmıştır. Denekler deney süresince 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık periyoduna uyularak, sıcaklığı 22±2 °C olarak ayarlanmış bir ortamda bakıldı. Hayvanlar 12 hafta boyunca % 88 kuru madde, % 23 protein, % 7 selüloz, % 8 ham kül, % 2 HCl'de çözülmeyen kül, % 1,5 kalsiyum, % 0,9 fosfor, % 0,7 sodyum, % 1 tuz, % 0,3 metiyonin ve %1 lizin içeren standart fare yemi ile beslendi ve içme suyu olarak çeşme suyu verildi. Deneklere uygulama her sabah 09.00- 12.00 arası yapıldı ve fareler haftalık olarak tartıldı.

5.1.1.Çalışma Grupları

Çalışmada dört deney grubu oluşturuldu:

HF-1 (High Fructose 1) grubu (n=10), 28 günlük farelere standart diyet uygulandı ve 12 hafta boyunca oral gavaj ile ağırlığı dikkate alınarak % 20 fruktoz içeren çeşme suyu verildi.

HF-2 (High Fructose 2) grubu (n=10), 28 günlük farelere 12 hafta boyunca standart diyet ve oral gavaj ile % 40 fruktoz içeren çeşme suyu verildi.

Hormon grubu (n=8), 92 günlük farelere 20 gün boyunca DHEA (dehidroepiandrosteron, 6 mg/100g/gün) susam yağı çözeltisinde (0,01ml 95% etanol içerisinde ve 0,09ml susam yağı) subkutan enjekte edildi (Tablo 5.1.1).

K (Kontrol) grubu (n=8) 28 günlük fareler 12 hafta boyunca standart yem ile beslendi ve hiçbir uygulama yapılmadı. Belirlenen sürelerin sonunda denekler sakrifiye edilerek overleri alındı.

Tablo 5.1.1.Çalışma grupları.

Deney	Süre	Çeşme suyunda % fruktoz miktarı
Grup 1; HF1 (High Fructose 1) Grubu (n=10)	12 hafta	Oral gavaj ile %20 fruktoz içeren çeşme suyu verilen grup.
Grup 2; HF2 (High Fructose 2) Grubu (n=10)	12 hafta	Oral gavaj ile %40 fruktoz içeren çeşme suyu verilen grup.
Grup3; H (Hormon) Grubu (n=8)	20 gün	6 mg/100g/gün olacak şekilde susam yağı çözeltisinde DHEA (0,01ml 95% etanol içerisinde ve 0,09ml susam yağı) verilen grup.
Grup 4; K (Kontrol) Grubu (n=8)		Hiçbir uygulama yapılmayan grup.

5.2.Kan Örneklerinin Alınması

Doku diseksiyonu yapılmadan önce tüm hayvanlardan LH, E2 ve Progesteron Hormonu düzeylerinin belirlenebilmesi için servikal dislokasyon ile kan örnekleri alındı.

5.3.Ovaryum Diseksiyonu

Deney süresi bitiminde, deneklere intraperitoneal olarak ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (100 mg/kg) anestezisi uygulandı. Deneklerin ağırlı uyarılara cevap vermedikleri anlaşıldıktan sonra, abdominal bölgeleri açıldı. Her grupta deneklerin sağ - sol overleri iki taraflı olarak alındı - sağ ışık mikroskobu, immünfloresan preparasyon için % 10'luk nötral tamponlu formalin (Sigma#SLBK3646V) içerisine, sol ise Western Blot analizi için kuru buz üzerine konuldu.

5.4.Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi

Alınan ovaryum örnekleri %10'luk nötral tamponlu formalin içerisine konularak tespit (fikse) edildi. Fikse olan dokular 24 saat musluk suyunda yıkanarak sırası ile aşağıdaki (Tablo 5.4) takip protokolü uygulandı.

Tablo 5.4. Işık Mikroskobu- İmmünfloresan metodu için doku takip protokolü.

1.Etil Alkol (%70)	1 saat
2.Etil Alkol (%90)	1 saat
3.Etil Alkol (%96)	1 saat
4.Etil Alkol (%100)	1 saat
5.Etil Alkol (%100)	30 dk
6.Toluen	30 dk
7.Toluen	30 dk
8.Parafin (56-58 °C)	2 saat
9.Parafin (56-58 °C)	12 saat
10.Parafin Bloklama	

Parafin bloklamanın ardından mikrotom (Thermo SCIENTIFIC, Microtom HM 340E) ile 5 µm kalınlığında kesilen dokular adheziv lamlara alındı.

5.5.Hematoksilen ve Eozin Boyama ile Genel Histolojik İnceleme

Hematoksilen ve Eozin boyaması yapılarak, gruplar genel morfoloji açısından incelenip karşılaştırıldı (Tablo 5.5).

Tablo 5.5.Hematoksilen ve Eozin boyama aşamaları.

• 60°C'lik etüvde deparafinizasyon	1 saat
• Toluen ile deparafinizasyon	10 dk
• % 100'lük Etil Alkol	10 sn
• % 96'lık Etil Alkol	10 sn
• % 70'lik Etil Alkol	10 sn
• Distile su ile yıkama	1 dk
• Hematoksilen'de bekletme	8 dk
• Çeşme suyu ile boyanın uzaklaştırılması	15 dk
• Eozin'de bekletme	1 dk
• Distile su ile yıkama	1dk
• % 70'lik Etil Alkol	10 sn
• % 96'lık Etil Alkol	10 sn
• % 100'lük Etil Alkol	10 sn
• Toluen	10 dk
• Mounting medium ile kapatma	

5.6.İmmunfloresan Yöntemi

54 °C'lik etüvde bir gece inkübe edilen parafin kesitler toluen ile deparafinize edilerek azalan etil alkol serileri ile rehidre edildi. PBS ile yıkanan kesitler 7 dakika citrate buffer (10 mM; pH:6,0) ile kaynatılarak antijen maskesi kaldırıldı. % 10'luk keçi serumu (NGS, Abcam) ile 1 saat nemli ortamda bloklamanın ardından tavşan poliklonal anti-fare (PLIN2, dilüsyon oranı: 1/100, Novusbio) ve guinea pig polyclonal anti-fare (PLIN3, dilüsyon oranı: 1/100, Progen) primer antikorları ile 1 gece +4 °C'da inkübe edildi. Primer antikorlar uzaklaştırılıp 3 kere PBS ile yıkanan kesitler 1 saat keçi anti-tavşan poliklonal (dilüsyon oranı: 1/500 Alexa Flour 488, Abcam) ve keçi anti-guinea pig poliklonal (dilüsyon oranı: 1/500, Alexa Flour 594,

Abcam) sekonder antikorları ile inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikor uzaklaştırılıp 3 defa PBS ile yıkanan kesitler kapatma mediumu (prolong gold antifade reagent with Dapi, Lifetechnologies) ile kapatıldı ve görüntüledi (Zeiss LSM 780 NLO Multifoton ve Konfokal Mikroskop).

5.7. Western Blot Analizi

5.7.1. Doku Ekstraktı Hazırlanması

1. Western blot analizi için – 80 °C’den alınan örnekler tartılarak uygun miktarda T-PER (Thermo Scientific# 78510) örnek tampon ve proteaz inhibitörü (PMSF, Roche#10837091001) eklenerek homojenizatörde (Next Advance, Bullet Blender) 5 dakika parçalanarak homojenize edildi.

2. 10 000 RPM’de santrifüj edilen örneklerden süpernatant alındı.

3. Süpernatantın içerdiği total protein miktarı Qubit protein ölçüm protokolüne göre tespit edildi.

4. Hazırlanan stok proteinler örnek yükleme solüsyonu (2x Laemmli Sample, BioRad# 161-0737) ile 1:1 oranda karıştırıldıktan sonra 95 °C’de 5 dakika kaynatıldı.

5.7.2. Western Blot Yöntemi

30 µg/ml oranında protein içeren numuneler hazır jellere yüklendi. Elektroforezde numuneler ilk önce 80 V 30 mA’de 10 dakika, sonrasında ise 120 V 30 mA’de jelin sonuna kadar yürütüldü. Elektrofezin ardından jeldeki proteinler membrana aktarıldı. Proteinlerin transferinden sonra, pH’sı 7,4 olan, % 0,1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu (TBS-T) ile yıkama yapılarak membran 1 saat süre ile oda ısısında TBS-T ile hazırlanan % 5’lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran daha sonra tavşan poliklonal anti-fare (PLIN2, dilüsyon oranı: 1/100, Novusbio) primer antikor ile 1 saat oda ısısında karıştırıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanarak, keçi anti tavşan IgG-HRP (dilüsyon oranı: 1/10000, Santa Cruz) sekonder antikor ile oda sıcaklığında karıştırıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandı

chemiluminisans ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip membrandaki protein bandlarının görüntülenmesi (Chemi DOC "MP İmaging System) yapıldı. Membranlar guinea pig poliklonal anti-fare (PLIN3, dilüsyon oranı: 1/100, Progen) ve tavşan anti-fare (β - actin: dilüsyon oranı: 1/2000, Abcam) primer antikoları için de +4°C'de 1 gece karıştırıcıda inkübe edildi. Ardından TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanarak keçi anti tavşan IgG-HRP (dilüsyon oranı: 1/10000, Santa Cruz) ve keçi anti guinea pig IgG-HRP (dilüsyon oranı: 1/10000, Santa Cruz) sekonder antikoları ile oda sıcaklığında karıştırıcıda 1 saat inkübe edildi. Geri kalan aşamalar PLIN2 için olduğu gibi uygulandı.

5.8.ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Deney grupları oluşturulduktan sonra, hayvanlardan kan örneği alınarak E2, LH ve progesteron hormonlarının gruplar arası farklılığının, doğrulanması için ELISA yöntemi uygulandı.

5.8.1.ELISA Yöntemi

-80 °C'de bekletilen örnekler çalışma öncesi derin dondurucudan çıkarıldı ve buz üstünde erimeleri beklendi. LH, E2 ve progesteron ELISA kitleri oda ısısına getirildi. Konsantre halde gelen yıkama solüsyonu, konsantre biyotinlenmiş antikor ve konsantre HRP konjugatı kullanıma hazır hale getirildi. Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standartın konacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi. Standartlar ikiye bölünerek çalışıldı. Standartlar, örnekler, dilüent, HRP konjugatı, biyotinitle antibody ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı:

LH:

1. Standart, örnek ve QC solüsyonlarının her birinden 100'er µl alınarak önceden belirlenmiş olan sıralamaya göre kuyucuklara koyuldu, 30 saniye iyice karıştırıldı ve üzeri parafilm ile kapatılarak 90 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

2. Daha sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı ve her kuyucuk üzerine biyotinlenmiş enzim konjuge LH solüsyonundan 100 µl eklendi, 30 saniye iyice karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

3. Süre bitiminde kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 3 kez, her defasında 300-350 µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.

4. Tüm kuyucuklara 100µl HRP konjugatı eklendi ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

5. Kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 5 kez her defasında 300-350 µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.

6. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat solüsyonundan eklendi ve 15 dakika 37°C'de inkübe edildi.

7. Ardından 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.

8. Kuyucuklar SpectraMax i3 Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu.

9. Standart eğrilerin oluşturulması ve değerlerin hesaplanması için Curve Expert 1,4 programı kullanıldı.

10. Hesaplamalar için $y = 2,02 + 6,77x - 1,26x^2$ denklemi kullanıldı.

Estradiol:

1. Standart, örnek ve QC solüsyonlarının her birinden 50 µl alınarak uygun kuyucuklara koyuldu.

2. Her kuyucuk üzerine enzim konjuge solüsyonundan 50 µl eklendi (boş kuyucuk hariç).

3. Tüm kuyucuklara anti-tavşan östradiol antikorundan 50 µl eklendi ve 30 saniye çalkalandıktan sonra 37 °C'de üzeri parafilm ile kapatılarak 1 saat inkübasyona bırakıldı.

4. Daha sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 3 kez, her defasında 300-350 µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.

5. Tüm kuyucuklara (boş kuyucuk da dahil) 100 µl TMB substrat solüsyonundan eklendi ve 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

6. Ardından 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.

7. Kuyucuklar SpectraMax i3 Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu.

8. Standart eğrilerin oluşturulması ve değerlerin hesaplanması için Curve Expert 1,4 programı kullanıldı.

9. Hesaplamalar için $y = 7,62 - 6,03x + 2,14x^2$ denklemi kullanıldı.

Progesteron:

1. Standart, örnek ve QC solüsyonlarının her birinden 100 µl alınarak uygun kuyucuklara koyuldu, 30 saniye iyice karıştırıldı ve üzeri parafilm ile kapatılarak 90 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

2. Daha sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı ve her kuyucuk üzerine biyotinlenmiş enzim konjuge progesteron solüsyonundan 100 µl eklendi, 30 saniye iyice karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

3. Süre bitiminde kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 3 kez her defasında 300-350 µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.

4. Tüm kuyucuklara 100µl HRP konjugatı eklendi ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

5. Kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 5 kez, her defasında 300-350 µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.

6. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat solüsyonundan eklendi ve 15 dakika 37°C'de inkübe edildi.

7. Ardından 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.

8. Kuyucuklar SpectraMax i3 Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu.

9. Standart eğrilerin oluşturulması ve değerlerin hesaplanması için Curve Expert 1,4 programı kullanıldı.

10. Hesaplamalar için $y = 7,38 + 8,59x$ denklemi kullanıldı.

5.9.İstatistiksel Değerlendirme

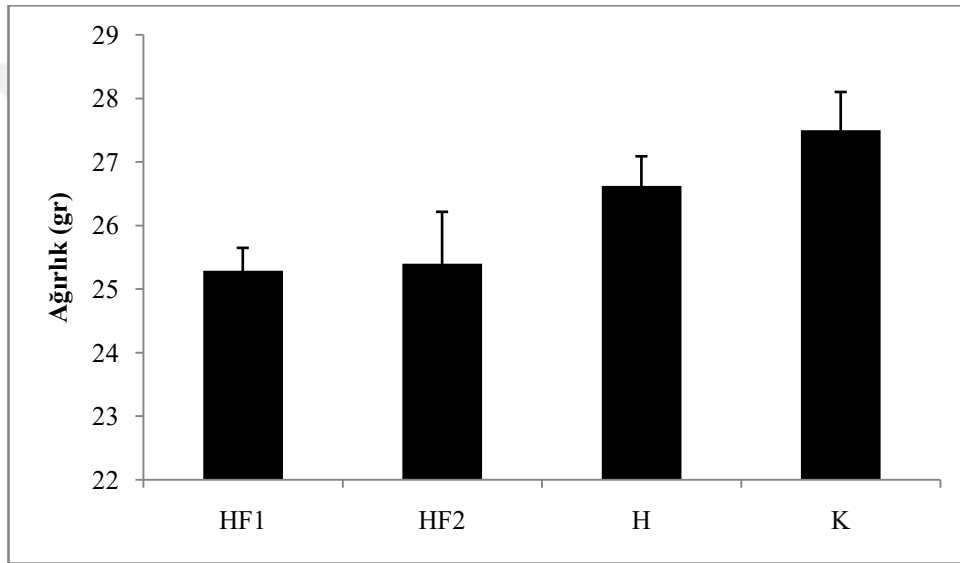
İstatistiksel analizler için SPSS 18,0 (IBM SPSS 22) istatistik paket programı kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama, standart sapma şeklinde gösterildi. Çalışma grupları tekyönlü varyans analizi (One- way ANOVA) ile değerlendirildi ve gruplar arası farklılıklar Tukey's HSD testi ile karşılaştırıldı. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



6.BULGULAR

6.1.Deneklerin Ağırlık Değerlendirilmesi

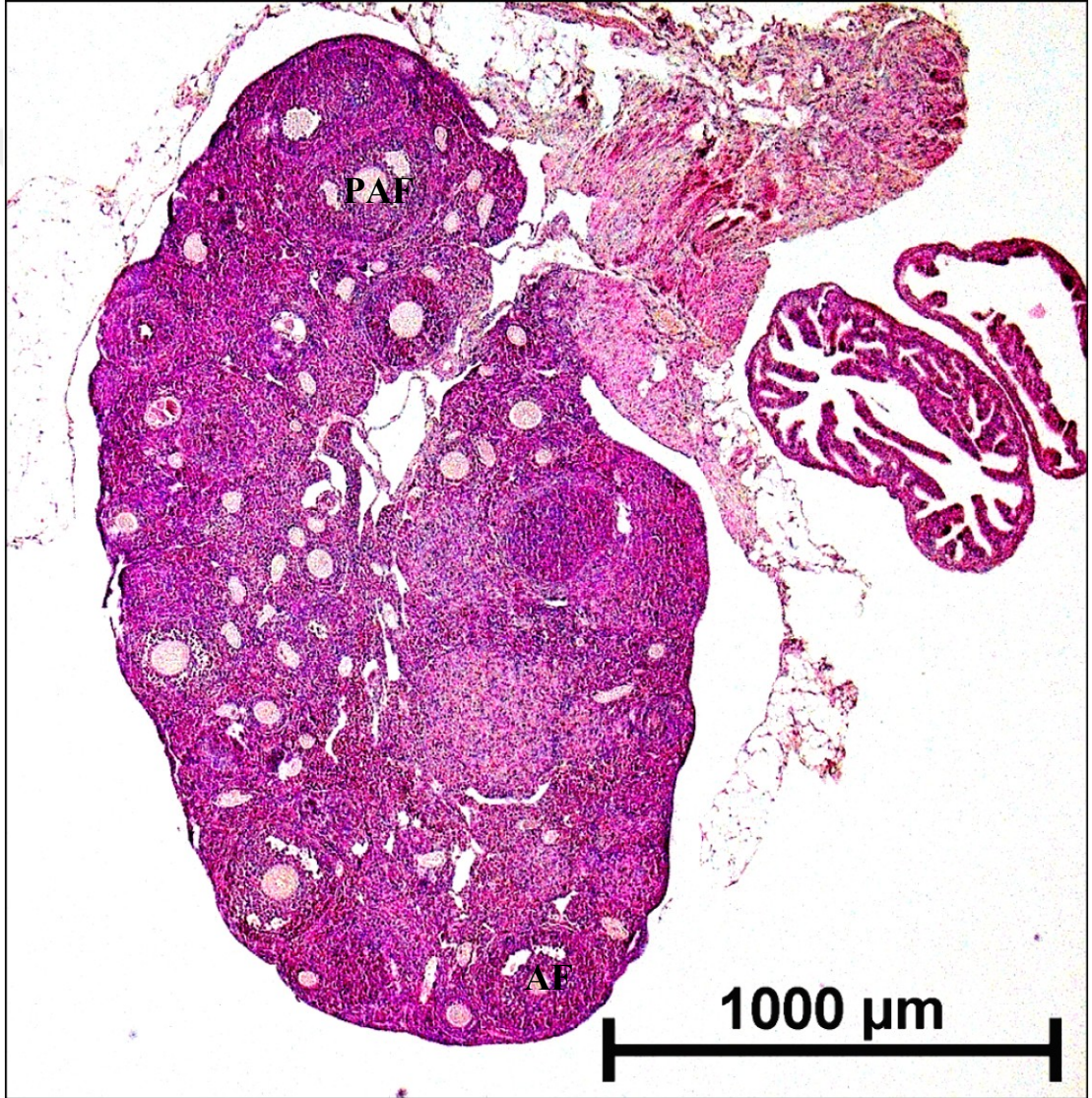
Gruplar arasındaki ağırlıklar karşılaştırıldığında HF1 grubunun diğer gruplara göre daha düşük ağırlığa sahip oldukları görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0,025$) (Şekil 6.1).



Şekil 6.1.Gruplar arasında ağırlıkların karşılaştırılması. HF-1: % 20 fruktoz grubu, HF-2: %40 fruktoz grubu, H: Hormon grubu, K: Kontrol grubu.

6.2.Hematoksilen ve Eozin Boyama ile Grupların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Gruplar arasındaki ovaryumları mikroskopik morfolojilerini karşılaştırmak amacıyla Hematoksilen ve Eozin boyama yapıldı. HF-1 grubunda antral ve preantral folikül sayısının kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu görüldü, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Resim 6.2.1).



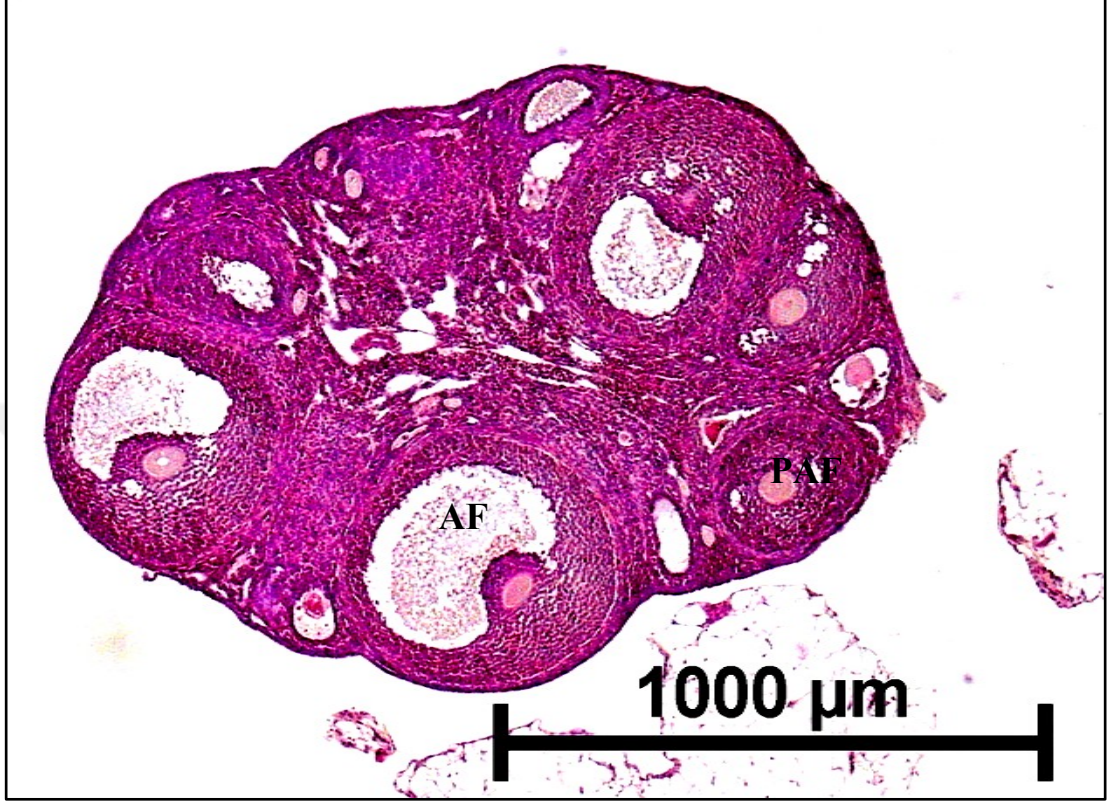
Resim 6.2.1.HF-1 grubu ovaryumu. Ovaryumda artan antral (AF) ve preantral (PAF) foliküller görülmekte (H-E) x4.

HF-2 grubunda primordiyal, primer, preantral ve antral foliküller ve korpus luteum yapıları görüldü (Resim 6.2.2).



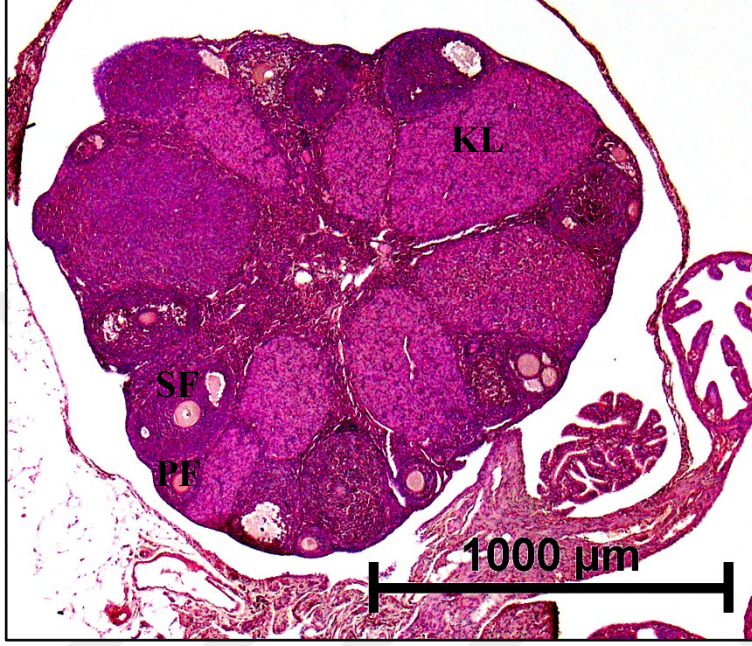
Resim 6.2.2.HF-2 grubu ovaryumu. Ovaryum antral (AF) ve preantral (PAF) foliküller ile korpus luteum (KL) yapılarını içermekte (H-E) x4.

Hormon grubu ovaryumunda artan antral ve preantral folikül sayısı (ortalama 8 folikül) istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0,020$) (Resim 6.2.3).

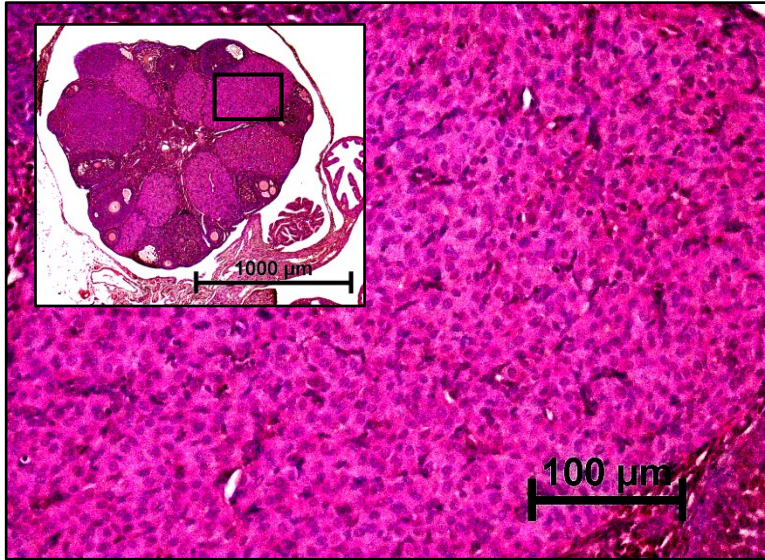


Resim 6.2.3. Hormon grubu ovaryumu. Ovaryum antral (AF) ve preantral foliküller (PAF) içermekte (H-E) x4.

Kontrol grubu ovaryumunda primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar tüm folikül gelişim aşamaları gözlemlendi. Normal yapıdaki foliküllerin yanı sıra önceki sıkluslara ait olan ve yeni oluşan korpus luteum yapıları da görüldü (Resim 6.2.4 ve 5).



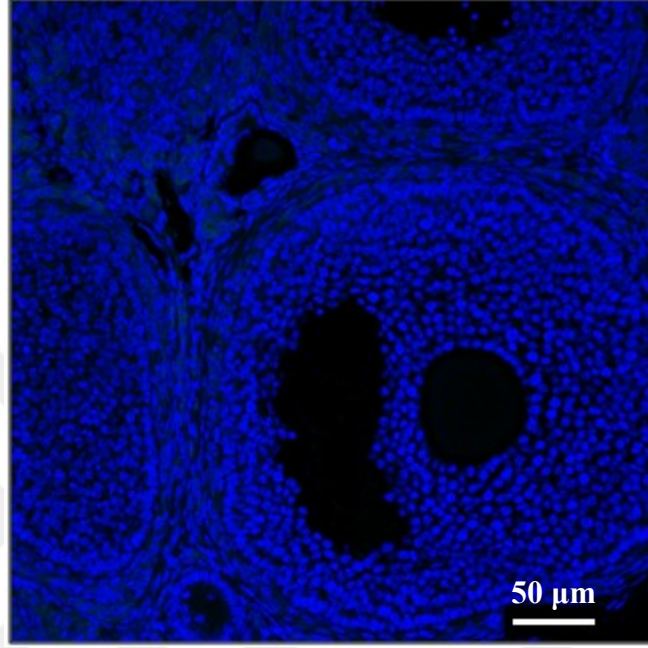
Resim 6.2.4.Kontrol grubu ovaryumu. Primer (PF) ve sekonder (SF) foliküller görülmekte. Periferde ovulasyonu takiben gelişmiş korpus luteum (KL) yapıları izlenmekte. Hematoksilen-Eozin (H-E) x4.



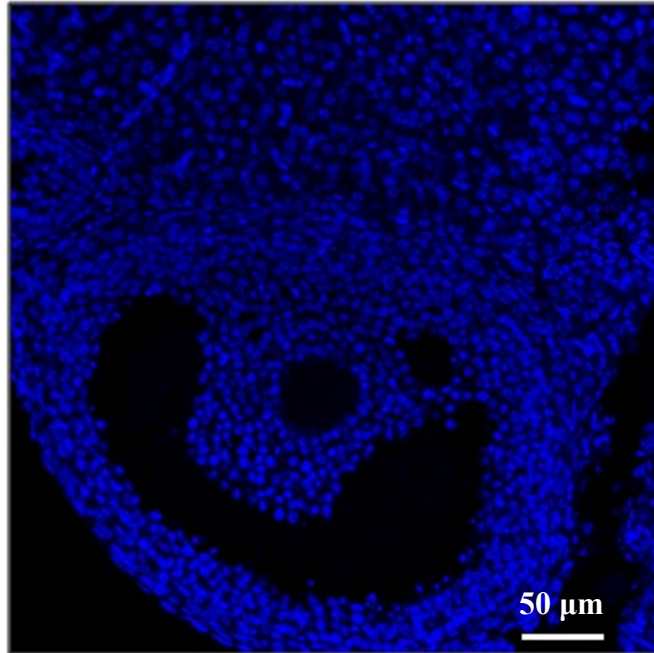
Resim 6.2.5.Kontrol grubu ovaryumu korpus luteum yapısı. Küçük resim kontrol grubu ovaryumunun genel görüntüsü (H-E) x20.

6.3.İmmunfloresan Yöntemi Bulguları

PLIN2 ve PLIN3 negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Resim 6.3.1 ve 2).



Resim 6.3.1.Kontrol grubu PLIN2 negatif kontrol kesitleri. X20



Resim 6.3.2.Kontrol grubu PLIN3 negatif kontrol kesitleri. X20

6.3.1.PLIN2

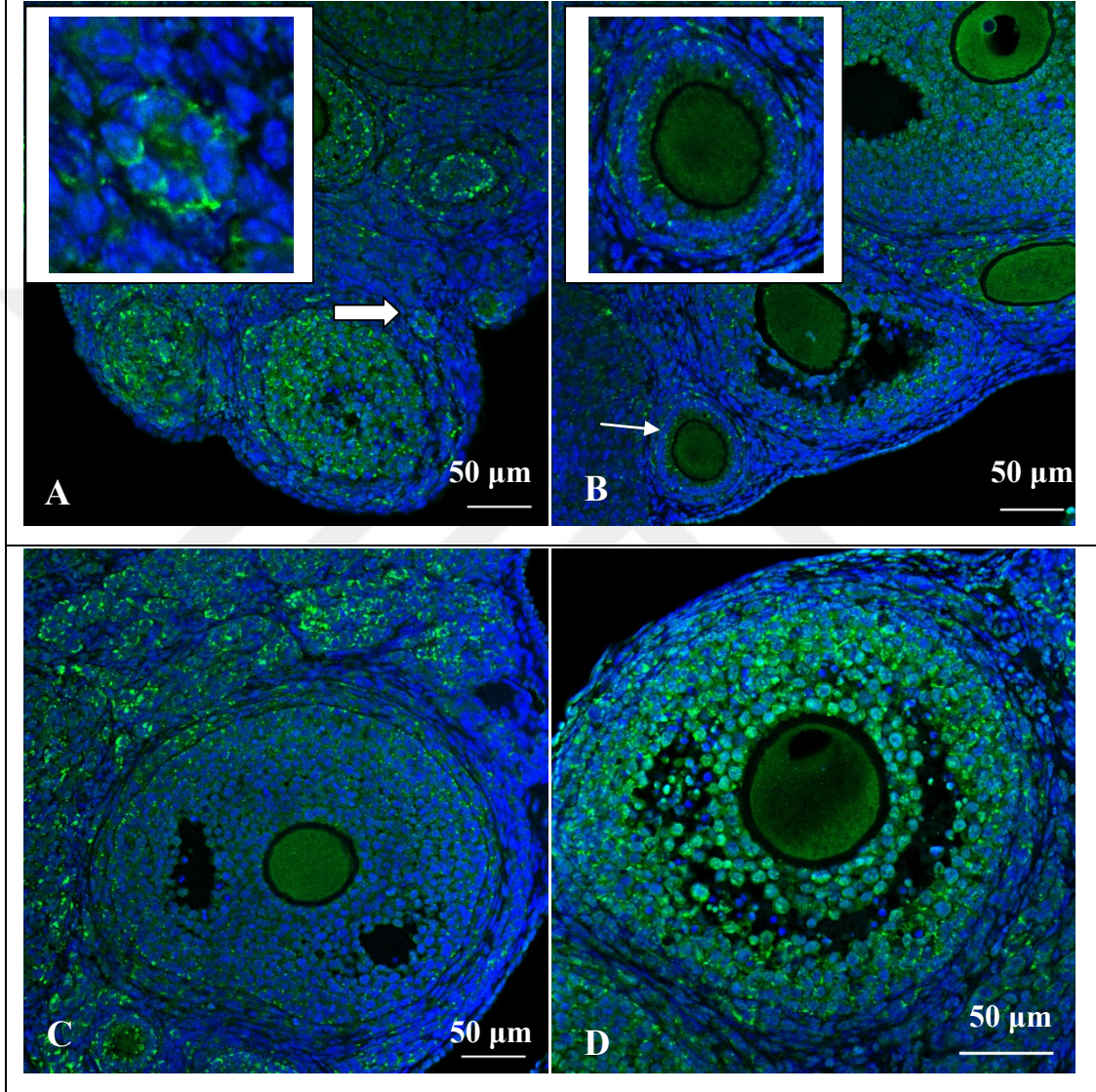
Folikülogenezin farklı gelişim aşamalarında PLIN2 ekspresyonu görülmekte (Tablo 6.3.1).

Tablo 6.3.1.Folikülün farklı gelişim aşamalarında PLIN2 floresan yoğunluğu.

	HF-1 (n=120)		HF-2 (n=88)		Hormon (n=206)		Kontrol (n=148)		p
	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	
Primordiyal folikül oosit	13,66	5,484	15,19	6,487	17,75	7,802	12,50	6,590	0,314
Primordiyal folikül granüloza hücreleri	16,69	4,663	17,06	7,028	17,55	6,300	15,14	7,825	0,868
Primer folikül oosit	16,96	12,221	15,37	9,392	18,22	7,249	15,42	7,127	0,745
Primer folikül granüloza hücreleri	20,68	16,447	18,04	8,714	20,22	8,253	17,67	5,697	0,776
Preantral folikül oosit	10,88*	6,830	12,82	5,146	16,53*	8,205	14,45	8,662	0,047
Preantral folikül granüloza hücreleri	15,57	10,310	16,42	6,227	20,57	9,766	19,72	9,242	0,148
Antral folikül oosit	8,76	3,660	12,15	4,464	16,68	10,671	12,12	4,871	0,089
Antral folikül granüloza hücreleri	12,11	4,589	16,74	5,571	19,68	8,838	16,85	6,533	0,121

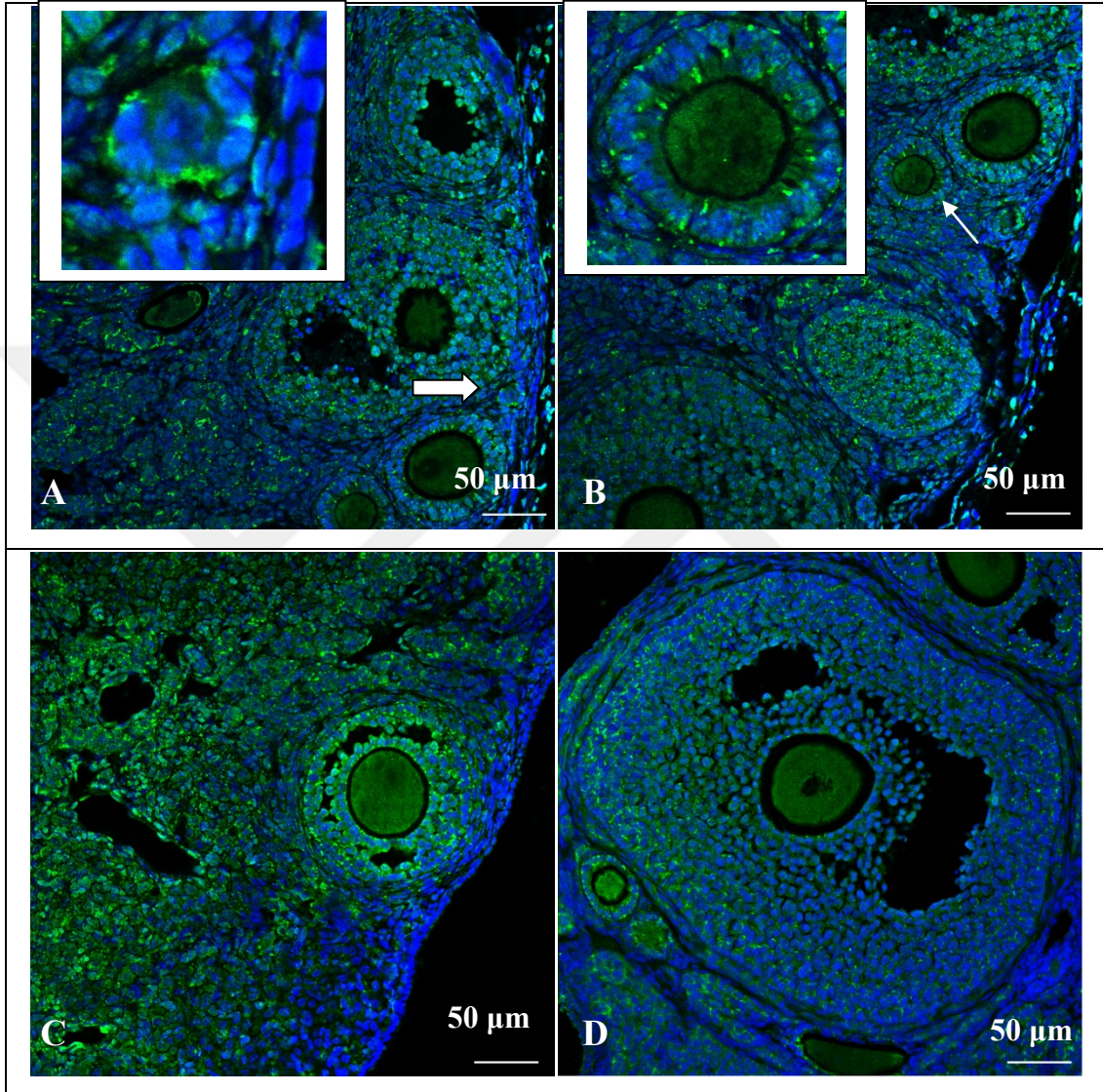
*p<0,05

HF-1 grubu: Foliküler gelişimin erken aşaması olan primordiyal folikülden itibaren, tüm foliküler aşamalarda oosit ve foliküler hücrelerde PLIN2 immün işaretlenmesi görüldü (Resim 6.3.1.1). Primer folikül granüloza hücrelerinde, preantral folikül oositine kıyasla PLIN2 ekspresyonu anlamlı derecede fazla gözlemlendi ($p = 0,057$).



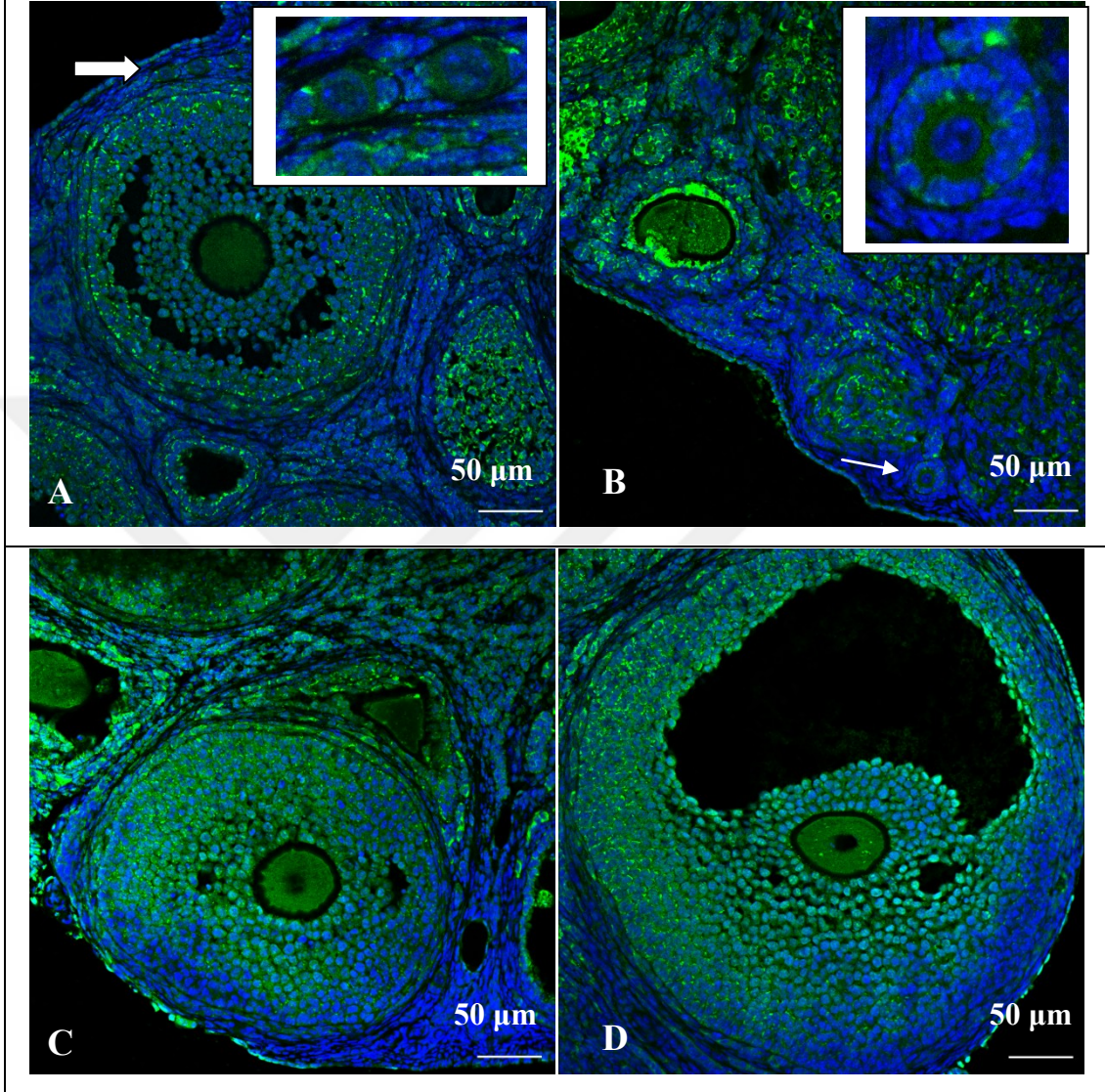
Resim 6.3.1.1.HF-1 grubu PLIN2 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D) . (Dapi; 405-mavi, PLIN2; 488-yeşil, X20).

HF-2 grubu: Folikül gelişim aşamaları süresince primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar oosit ve folikül hücrelerinde PLIN2 immün işaretlenme görüldü (Resim 6.3.1.2).



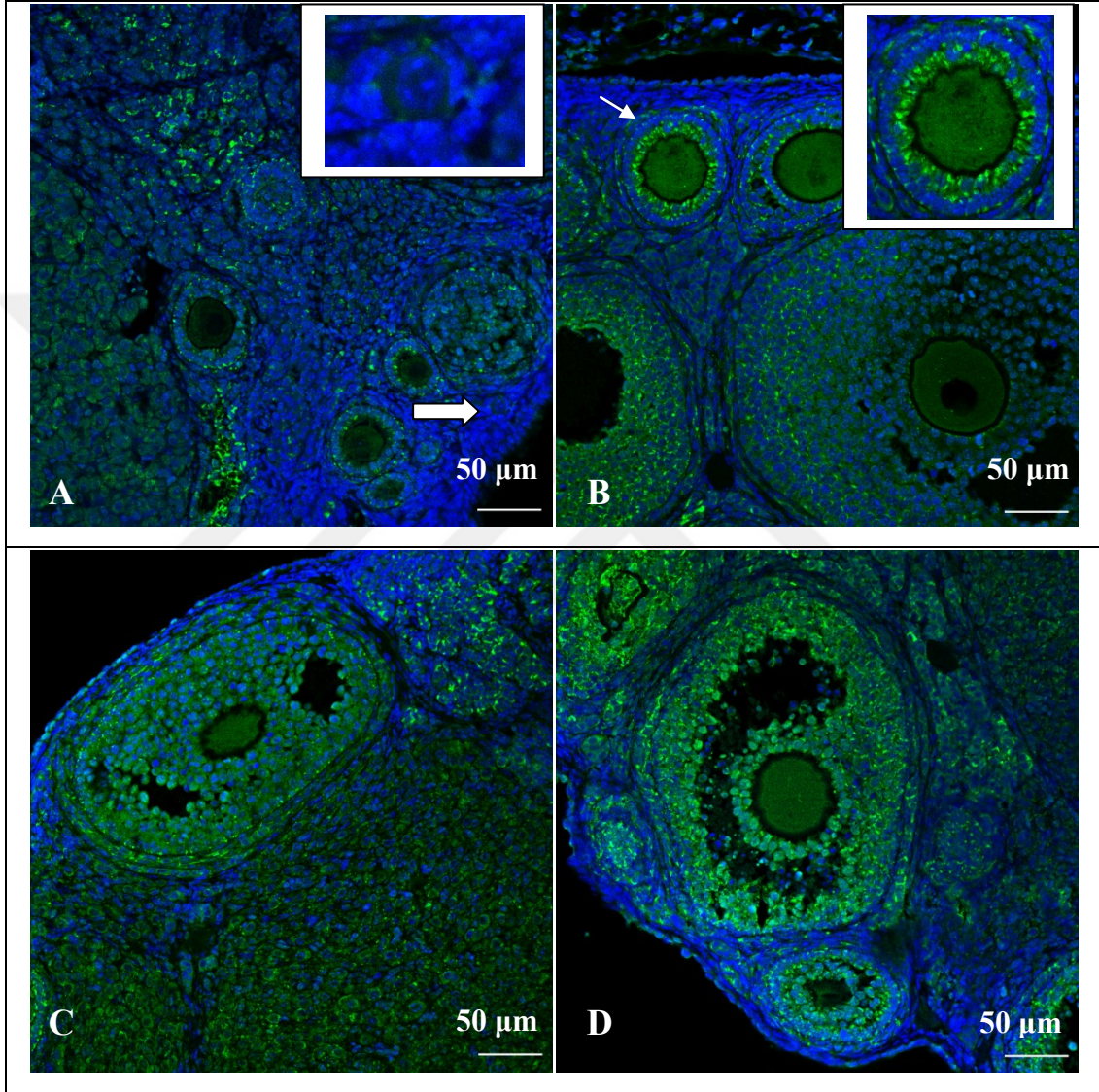
Resim 6.3.1.2.HF-2 grubu PLIN2 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granuloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granuloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granuloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granuloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D) . (Dapi; 405-mavi, PLIN2; 488-yeşil, X20).

Hormon grubu: Foliküler gelişimin her safhasındaki foliküllerde PLIN2 ekspresyonu görüldü (Resim 6.3.1.3).



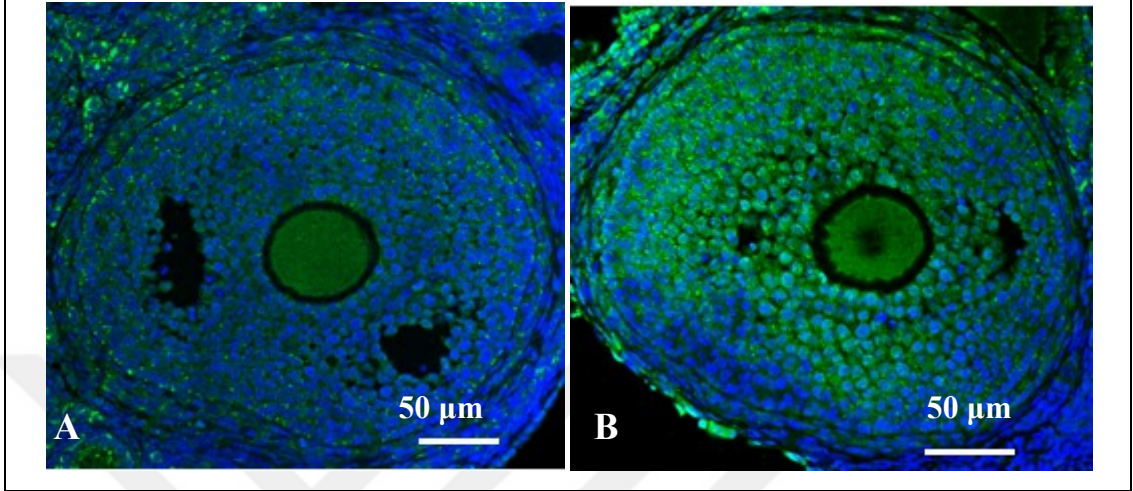
Resim 6.3.1.3.Hormon grubu PLIN2 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D). (Dapi; 405-mavi, PLIN2; 488-yeşil, X20).

Kontrol grubu: Foliküler gelişimin her aşamasındaki foliküllerde PLIN2 ekspresyonu görüldü. Grup kendi içerisinde karşılaştırıldığında preantral folikül granüloza hücrelerinde antral folikül oositine göre daha fazla PLIN2 ekspresyonu görüldü ($p = 0,036$) (Resim 6.3.1.4).



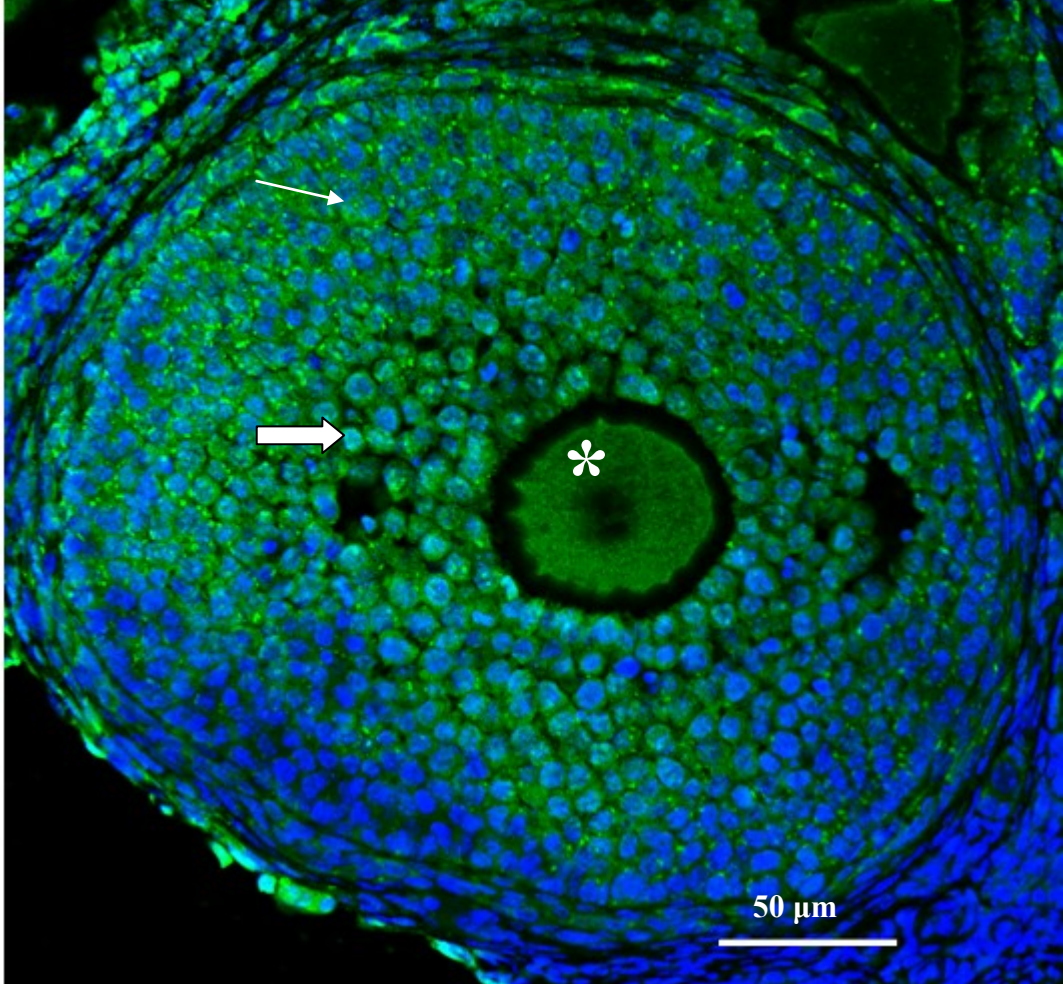
Resim 6.3.1.4. Kontrol grubu PLIN2 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D) . (Dapi; 405-mavi, PLIN2; 488-yeşil, X20).

Gruplar arası karşılaştırma: Hormon grubu preantral folikül oositinde, HF-1 grubu preantral folikül oositine kıyasla daha fazla PLIN2 ekspresyonu saptandı ($p = 0,047$) (Resim 6.3.1.5).



Resim 6.3.1.5. HF-1 (A) ve Hormon (B) grubu preantral folikül PLIN2 karşılaştırması. $P = 0,047$. (Dapi; 405-mavi, PLIN2; 488-yeşil, X20).

PLIN2 ekspresyonu oosit ve granüloza hücre sitoplazmasında görülmekte (Resim 6.3.1.6).



Resim 6.3.1.6. PLIN2'nin oosit sitoplazmasında (asterisk) ve granüloza hücre sitoplazmasında (ince ok) ekspresyonu, granüloza hücre nukleusları (kalın ok) (DAPI). (Dapi; 405-mavi, PLIN2; 488-yeşil, X20).

6.3.2.PLIN3

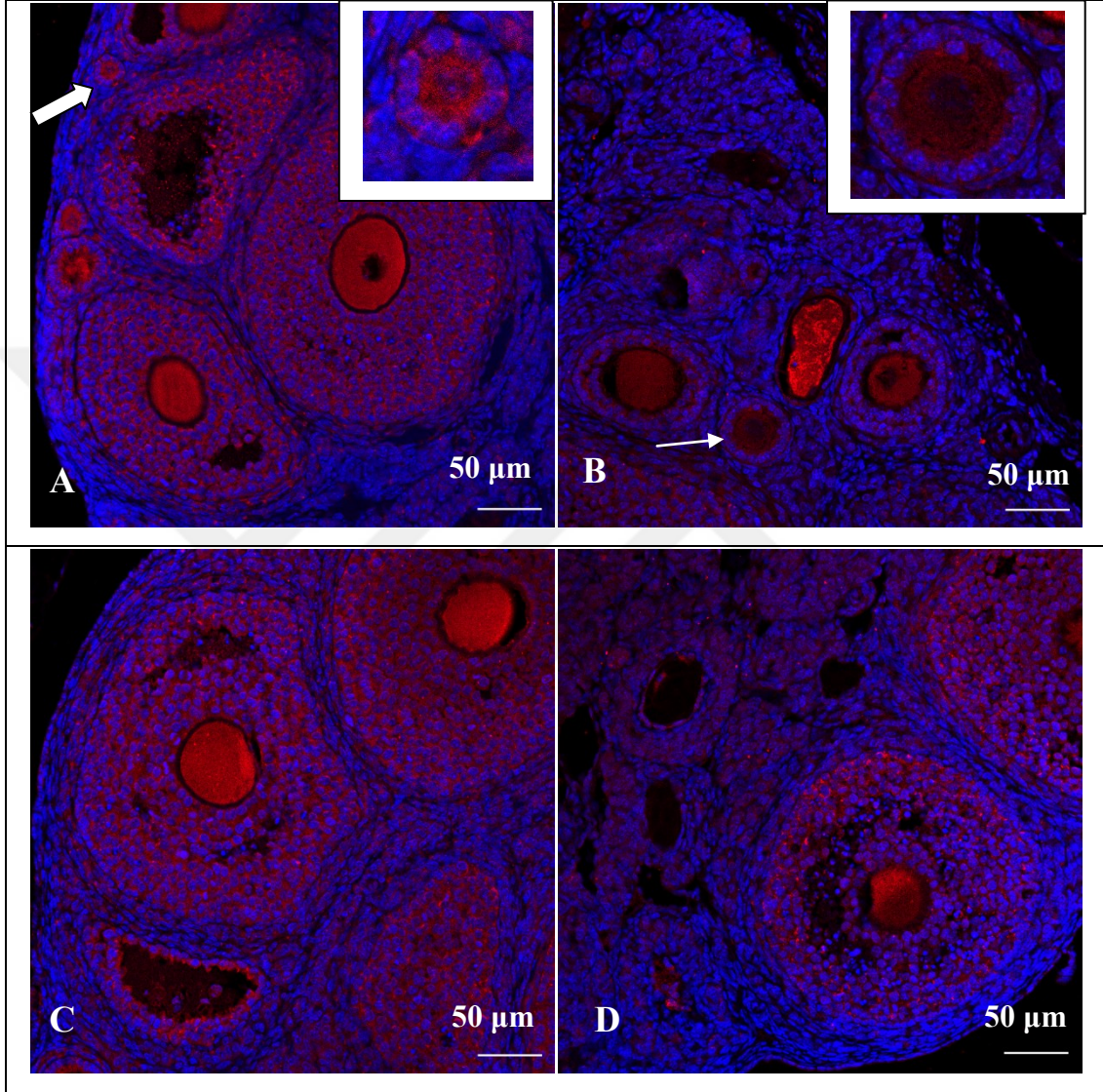
Folikül gelişiminin primordiyal folikül aşamasından antral folikül aşamasına kadar oosit ve granüloza hücre sitoplazmasında PLIN3 ekspresyonu görülmekte (Tablo 6.3.2).

Tablo 6.3.2.Folikülün farklı gelişim aşamalarında PLIN3 floresan yoğunluğu.

	HF-1 (n=144)		HF-2 (n=79)		Hormon (n=186)		Kontrol (n=142)		p
	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	ort	s.sapma	
Primordiyal folikül oosit	9,92	10,904	10,89	5,788	8,13	2,880	7,19	5,385	0,676
Primordiyal folikül granüloza hücreleri	7,41	7,129	9,26	5,759	8,29	2,352	5,93	4,069	0,612
Primer folikül oosit	17,70*	12,304	13,90	8,005	9,95*	4,765	13,13	8,656	0,024
Primer folikül granüloza hücreleri	15,72*	11,060	12,80	7,949	8,52*	3,771	10,48	6,638	0,010
Preantral folikül oosit	17,04	14,142	13,69	7,500	14,23	10,195	17,89	11,295	0,530
Preantral folikül granüloza hücreleri	12,55	10,038	9,82	4,693	9,91	6,301	12,66	7,390	0,388
Antral folikül oosit	13,91	11,362	13,21	7,517	16,67	11,762	17,85	11,940	0,756
Antral folikül granüloza hücreleri	10,55	11,443	7,35	1,142	9,28	5,077	11,94	7,386	0,457

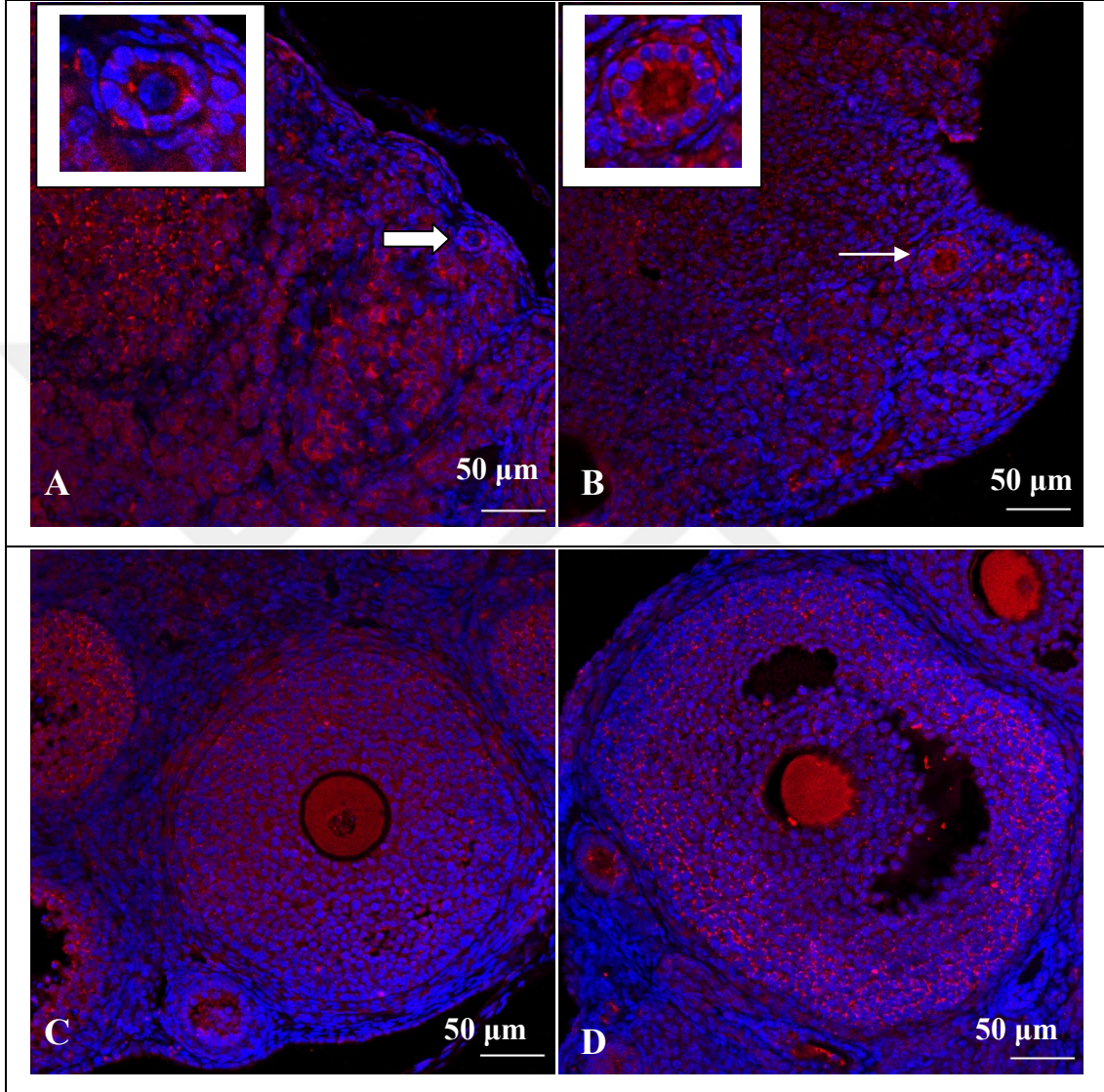
*p<0,05

HF-1 grubu: Folikül gelişim aşamaları süresince primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar oosit ve folikül hücrelerinde PLIN3 ekspresyonu görüldü (Resim 6.3.2.1).



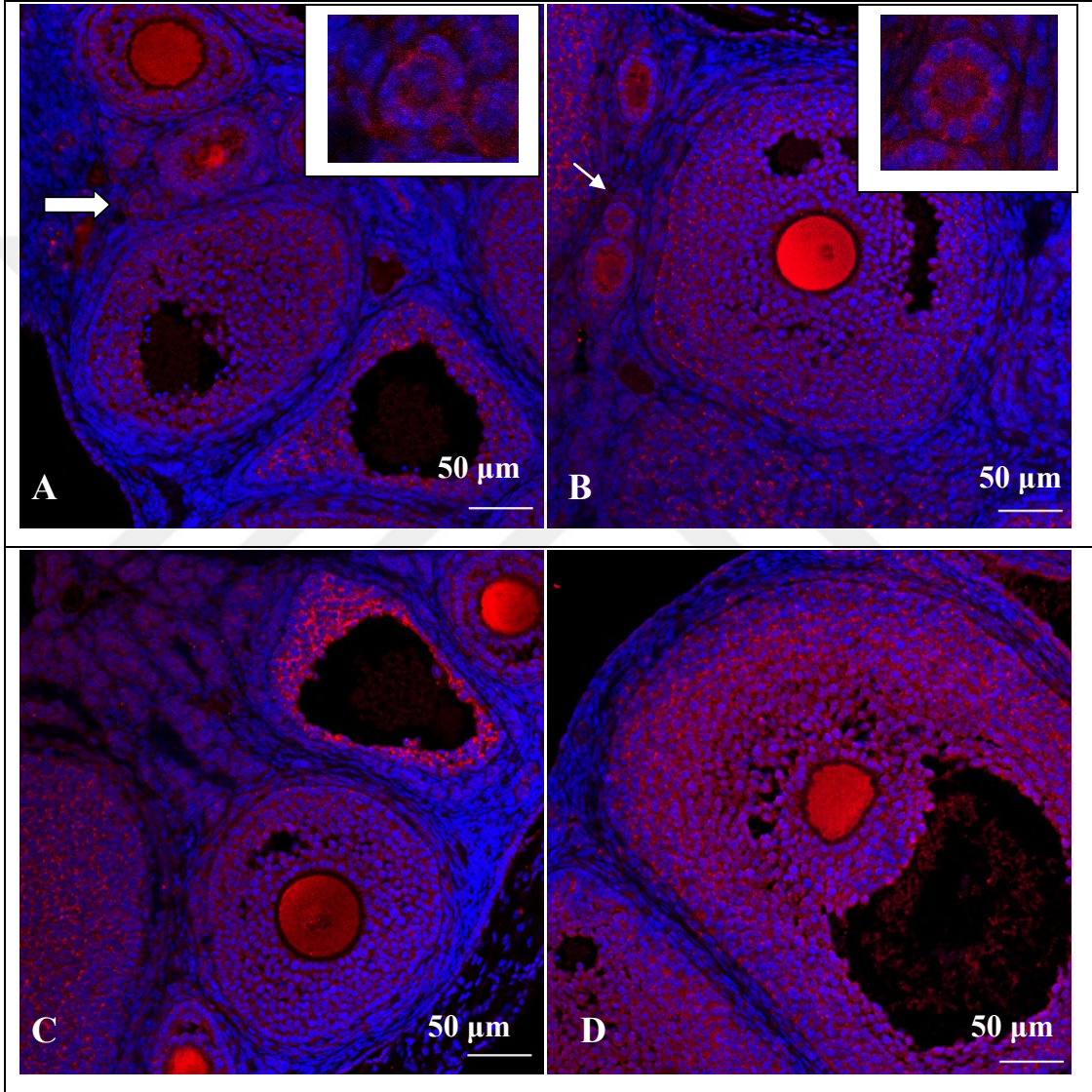
Resim 6.3.2.1.HF-1 grubu PLIN3 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D). (Dapi; 405-mavi, PLIN3; 594-kırmızı, X20).

HF-2 grubu: Folikül gelişim aşamaları süresince primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar oosit ve folikül hücrelerinde PLIN3 ekspresyonu görüldü (Resim 6.3.2.2).



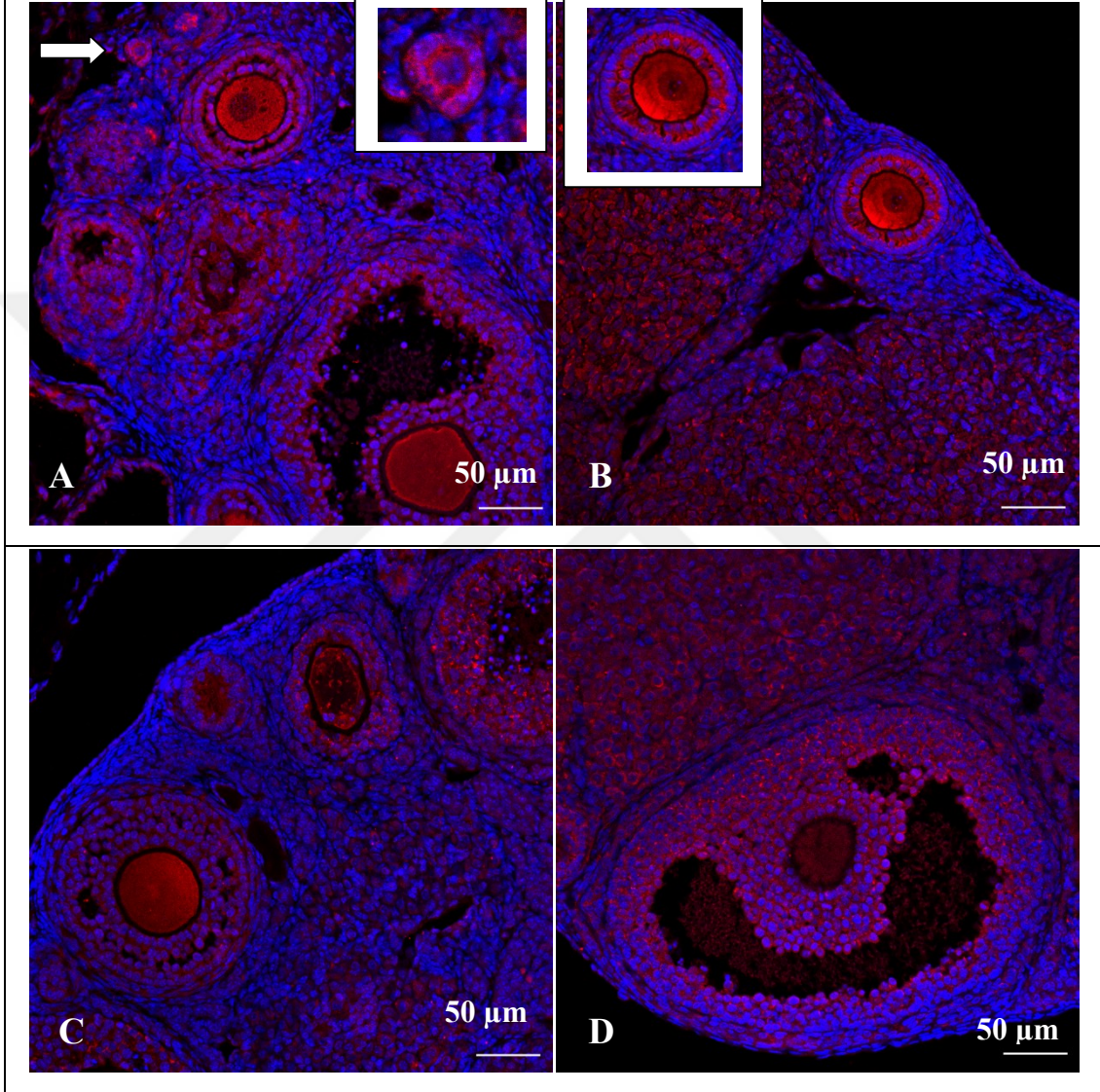
Resim 6.3.2.2.HF-2 grubu PLIN3 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D). (Dapi; 405-mavi, PLIN3; 594-kırmızı, X20).

Hormon grubu: Folikül gelişim aşamaları süresince primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar oosit ve folikül hücrelerinde PLIN3 ekspresyonu görüldü (Resim 6.3.2.3). Antral folikül oositinde, antral folikül granüloza hücreleri, primer folikül oositi ve granüloza hücreleri ve preantral folikül granüloza hücrelerine göre daha fazla PLIN3 ekspresyonu gözlemlendi ($p = 0,000$).



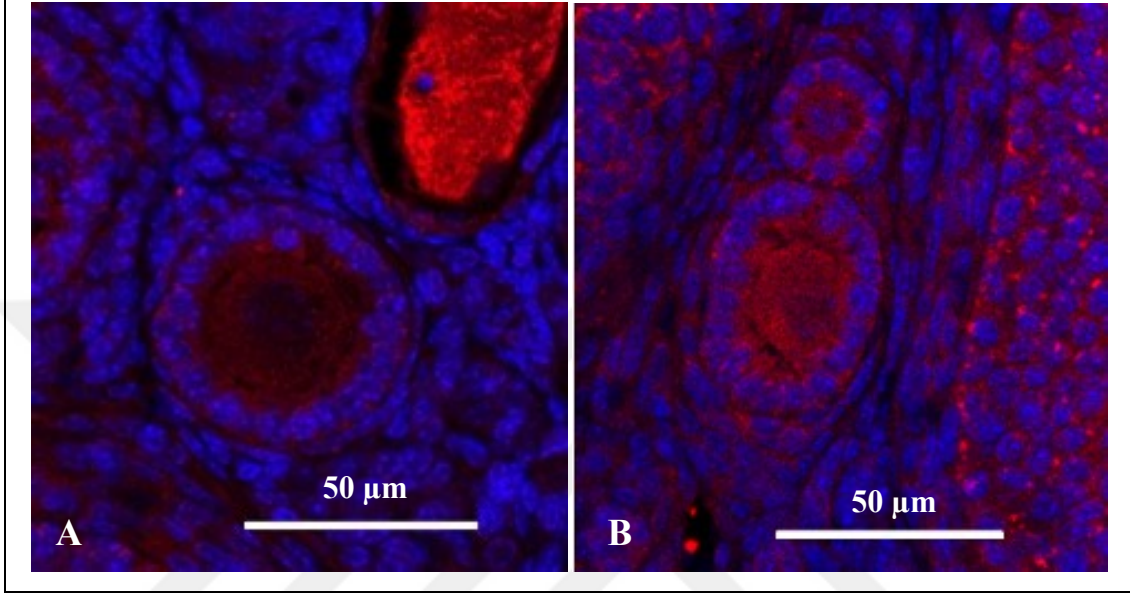
Resim 6.3.2.3. Hormon grubu PLIN3 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (ince ok) (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D). (Dapi; 405-mavi, PLIN3; 594-kırmızı, X20).

Kontrol grubu: Folikül gelişim aşamaları süresince primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar oosit ve folikül hücrelerinde PLIN3 ekspresyon görüldü (Resim 6.3.2.4). Primordiyal folikül granüloza hücrelerinde, preantral folikül oositine göre daha az PLIN3 ekspresyonu gözlemlendi ($p = 0,003$).



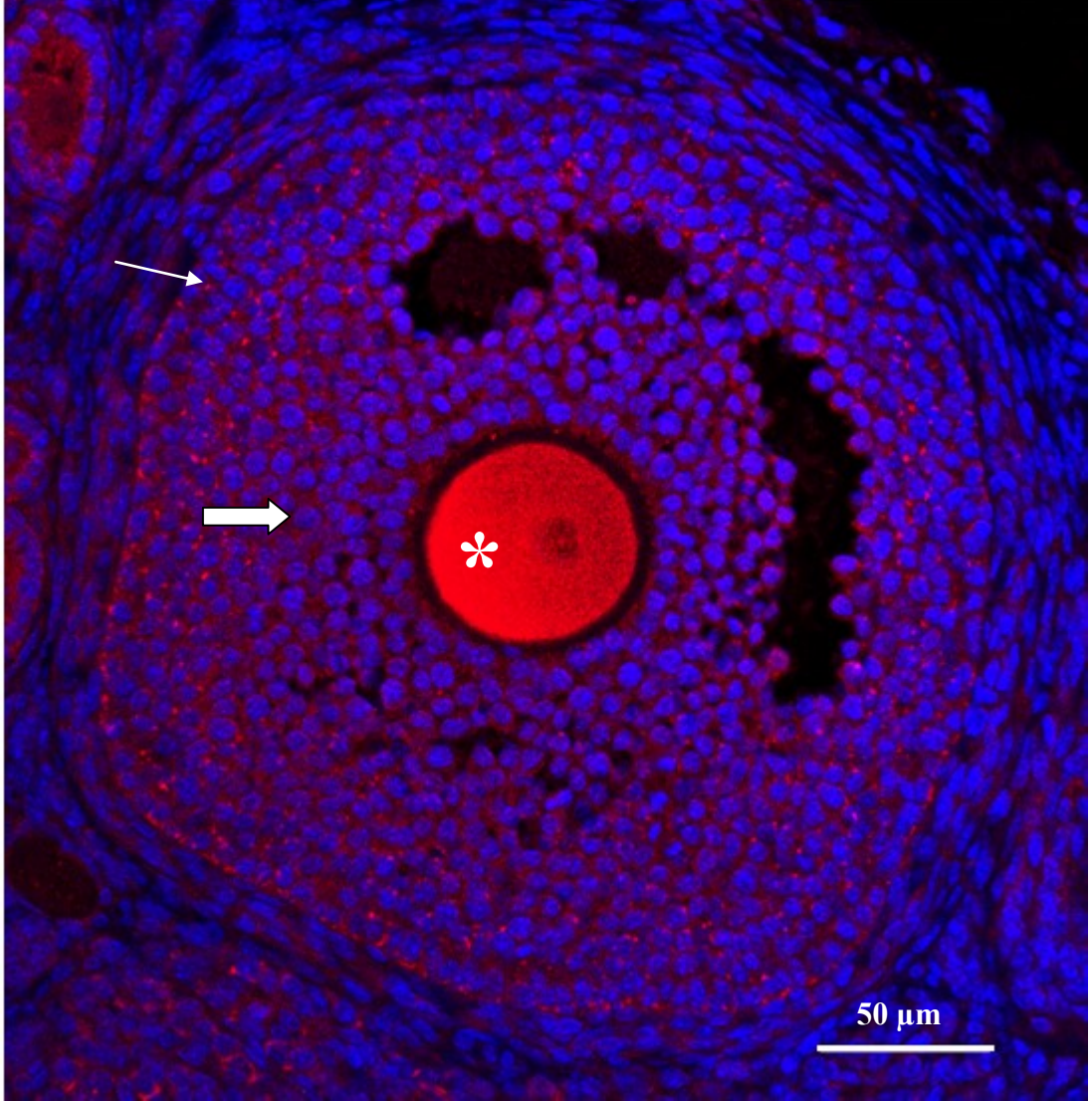
Resim 6.3.2.4.Kontrol grubu PLIN3 floresan yoğunluğu. Primordiyal foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (kalın ok) (A), primer foliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (B), preantral folikül oosit ve granüloza hücrelerinde immün işaretlenme (C), antral folikül oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immün işaretlenme (D). (Dapi; 405-mavi, PLIN3; 594-kırmızı, X20).

Gruplar arası karşılaştırma: HF-1 grubu primer folikül oositinde ve granüloza hücrelerinde, Hormon grubu oositi ve granüloza hücrelerine göre PLIN3 ekspresyonu daha fazla saptandı (oosit karşılaştırmaları için $p = 0,024$) (granüloza hücreleri karşılaştırmaları için $p = 0,010$) (Resim 6.3.2.5).



Resim 6.3.2.5.HF-1 (A) ve Hormon (B) grubu primer folikül. $P < 0,010$, (Dapi; 405-mavi, PLIN3; 594-kırmızı, X20).

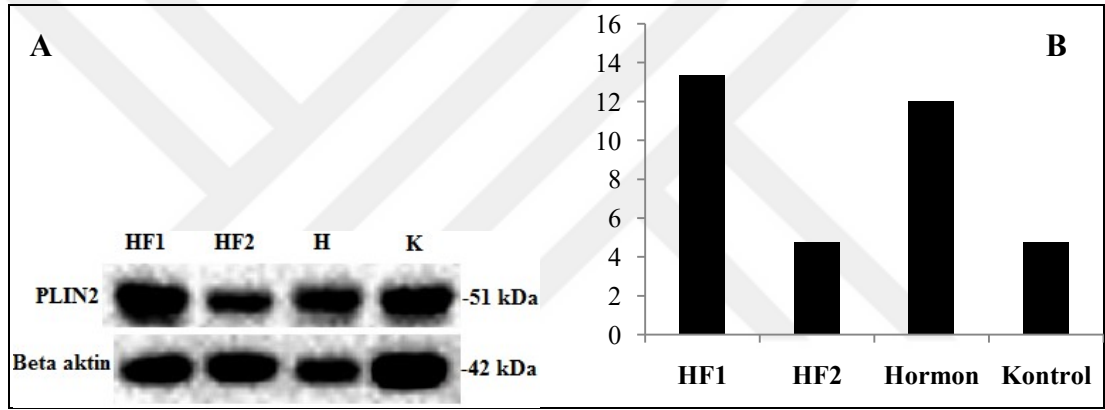
PLIN3 ekspresyonu oosit ve granüloza hücre sitoplazmasında görülmekte (Resim 6.3.2.6).



Resim 6.3.2.6. PLIN3'ün oosit sitoplazmasında (asterisk) ve granüloza hücre sitoplazmasında (ince ok) ekspresyon, granüloza hücre nukleusları (kalın ok) (DAPI). (Dapi; 405-mavi, PLIN3; 594-kırmızı, X20).

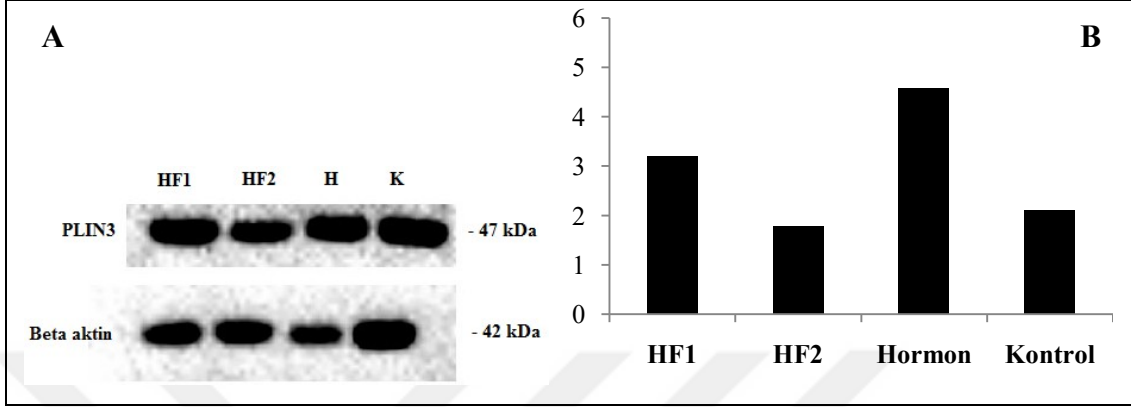
6.4. Western Blot Analizi Bulguları

Deney gruplarından alınan ovaryumların protein izolasyonu yapılmasının ardından PLIN2 ve PLIN3 proteinlerinin yoğunlukları western blot yöntemi ile belirlendi. Kuyucuklardaki proteinlerin eşit miktarda olup olmadıklarını kontrol etmek amacı ile beta aktin antikoru kullanıldı. Kuyucuklardaki bant kalınlıkları beta aktin bant kalınlıklarına göre standardize edildi. PLIN2 için HF-1, HF-2, Hormon ve Kontrol gruplarına ait Western Blot bantları görüntülendi (Şekil 6.4.1.A). HF-1 ve Hormon grubu PLIN2 protein miktarının diğer kontrol ve HF-2 grubuna kıyasla daha fazla olduğu görüldü (Şekil 6.4.1.B).



Şekil 6.4.1. PLIN2 protein yoğunluğunun western bantları izlenmekte (A). PLIN2 protein yoğunluğu gruplar arasında fark göstermektedir (B). HF-1: % 20 fruktoz grubu, HF-2: %40 fruktoz grubu, H: Hormon grubu, K: Kontrol grubu.

HF-1, HF-2, Hormon ve Kontrol gruplarında PLIN3 bantlarına bakıldığında HF-1 ve Hormon grubunda protein yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü (Şekil 6.4.2.).

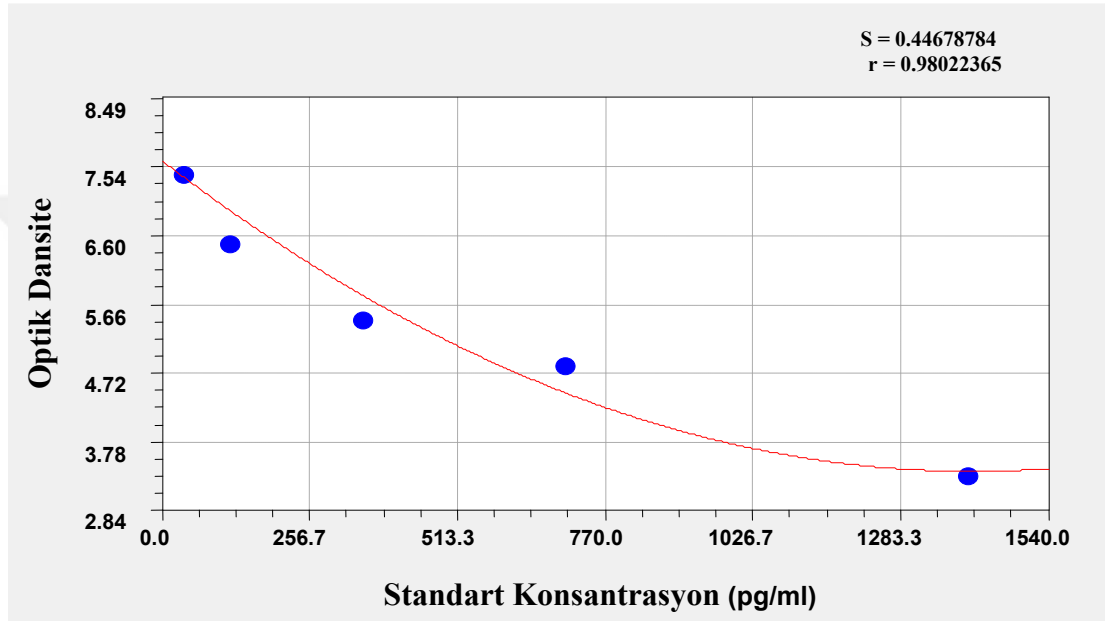


Şekil 6.4.2. PLIN3 protein yoğunluğunun western bantları izlenmekte (A). PLIN3 protein yoğunluğu gruplar arasında fark göstermektedir (B). HF-1: % 20 fruktoz grubu, HF-2: %40 fruktoz grubu, H: Hormon grubu, K: Kontrol grubu.

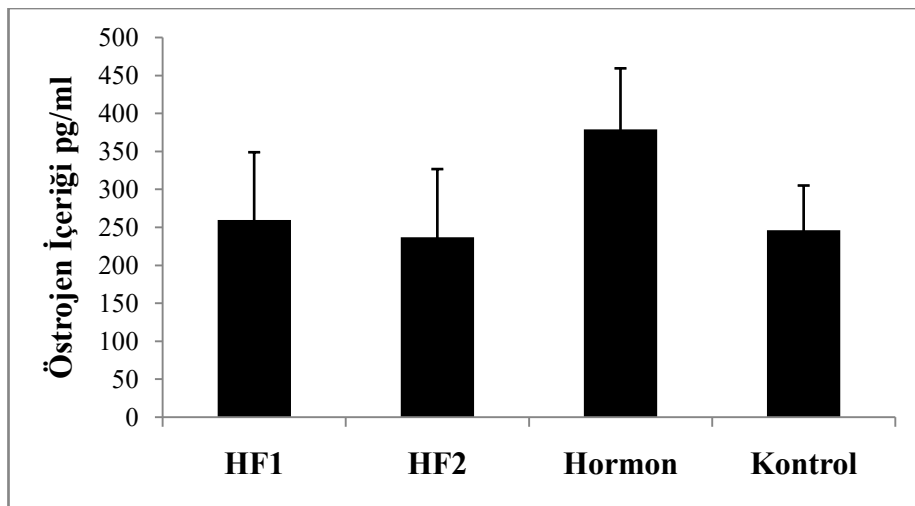
6.5.ELISA Bulguları

Östradiol

Alınan serumlardan E2 miktarına bakıldığında HF-1 ve Hormon grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 6.5.1 ve 2). Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).



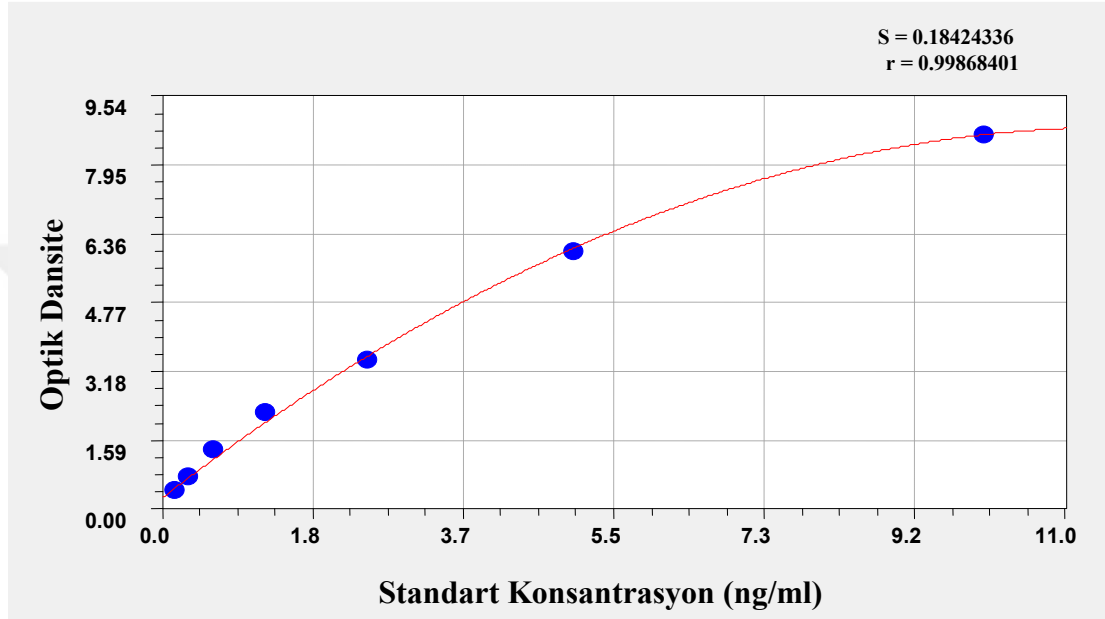
Şekil 6.5.1.Östradiol için standart konsantrasyon eğrisi.



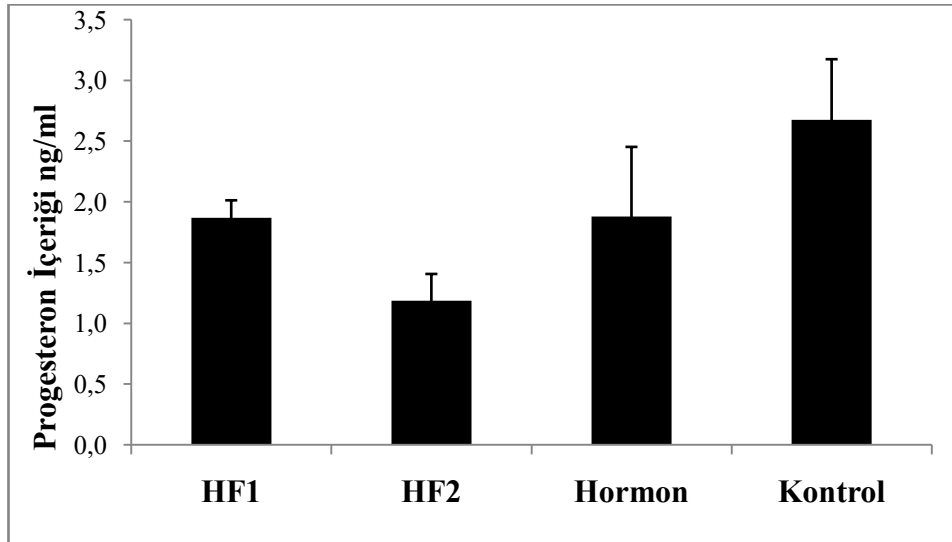
Şekil 6.5.2.Gruplar arasında serum östradiol seviyelerinin karşılaştırılması. HF-1: % 20 fruktoz grubu, HF-2: %40 fruktoz grubu, H: Hormon grubu, K: Kontrol grubu.

Progesteron

Serumlardan bakılan progesteron miktarının HF-1, HF-2 ve Hormon grubunda Kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü, bununla birlikte sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 6.5.3. ve 4).



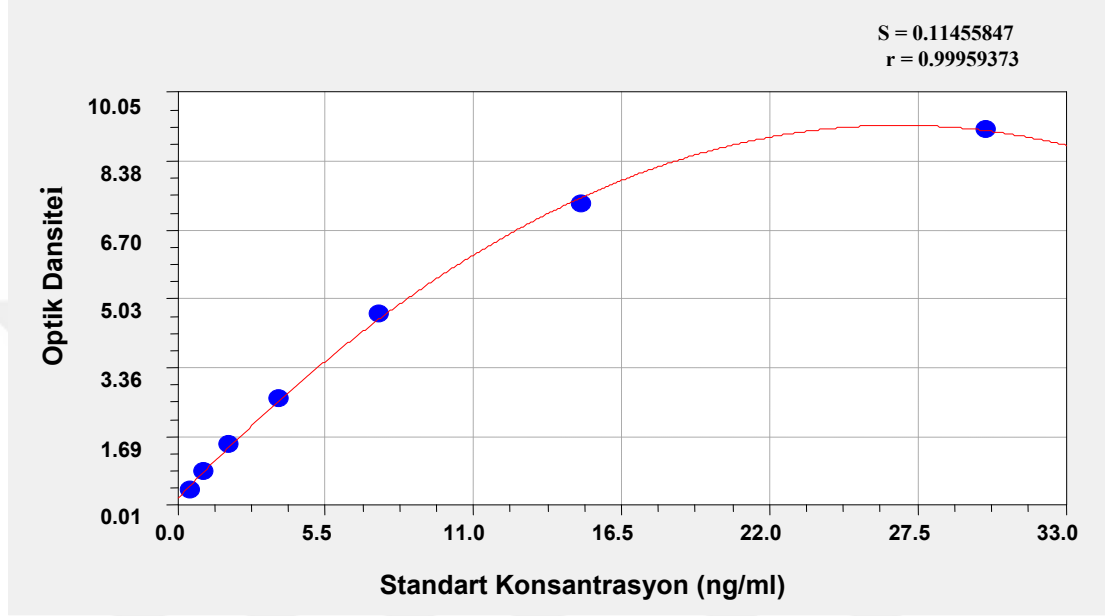
Şekil 6.5.3. Progesteron için standart konsantrasyon eğrisi.



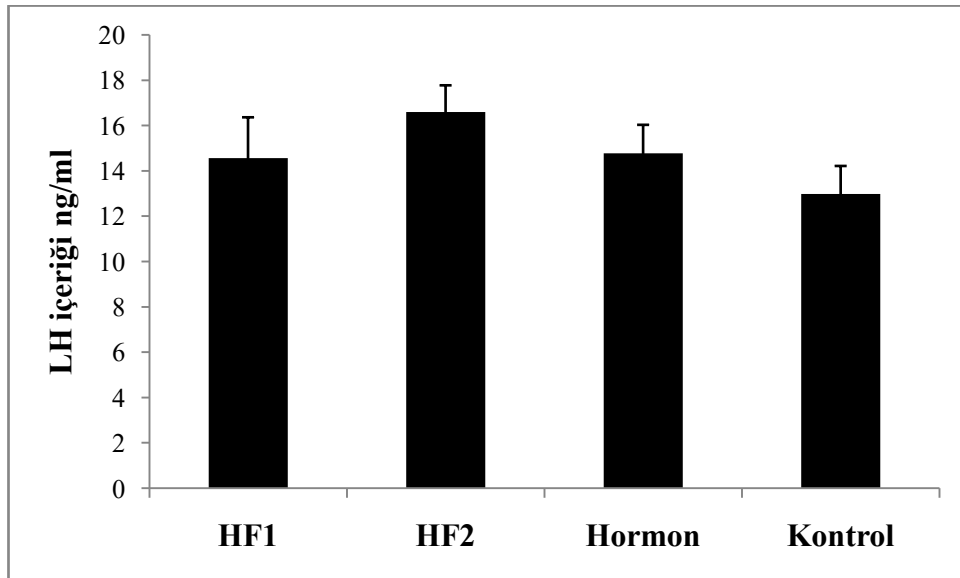
Şekil 6.5.4. Gruplar arasında serum progesteron seviyelerinin karşılaştırılması. HF-1: % 20 fruktoz grubu, HF-2: %40 fruktoz grubu, H: Hormon grubu, K: Kontrol grubu.

Luteinleştirici Hormon

HF-1, HF-2 ve Hormon gruplarına ait serum LH seviyelerinin Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 6.5.5 ve 6). Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).



Şekil 6.5.5. LH için standart konsantrasyon eğrisi.



Şekil 6.5.6. Gruplar arasında serum Luteinleştirici Hormon seviyelerinin karşılaştırılması. HF-1: % 20 fruktoz grubu, HF-2: %40 fruktoz grubu, H: Hormon grubu, K: Kontrol grubu.

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

PCOS üreme çağındaki kadınların % 5 ile % 13,9'unu etkileyen heterojen ve kompleks bir bozukluktur (8, 9). PCOS fazla miktarda LH salgılanması, ovaryan hiperandrojenizm, insülin direncinden kaynaklanan hiperinsülinemi ve doğurganlıktaki düşüş ile karakterize edilmektedir (75).

Klinik belirtilerin ergenlik döneminde görülmesi nedeni ile, hastalığın daha erken dönemlerde başladığına inanılmaktadır. Hastalık gelişiminin intrauterin çevreden kökenlendiği düşünülmektedir (166). Etnik ve jeografik heterojeniteye bakıldığında ise genetik ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu görülmektedir (167, 168). Postnatal çevresel faktörler arasında diyet, obezite, sedanter yaşam şekli, çevresel toksinler ve ilaçlar bulunmaktadır (169).

Çevresel faktörler'den biri olan diyet, günlük tüketilen şeker miktarının artması ile daha da önem kazanmaktadır. Günlük diyet ile alınan fruktoz miktarının artması, TG ve glikoza dönüşmesi nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir (16, 17). Yüksek fruktoz alımının sonucu olarak artmış glikojen sentezi, DNL ve TG sentezi gerçekleşmektedir (17, 18). Hayvan deneylerinde insülin direnci oluşturmak için tercih edilen modellerden birisi yüksek konsantrasyonda (%20-25) fruktoz verilmesidir. Yapılan çalışmalarda fruktoz ile beslenen sıçanların çoğunda insülin duyarlılığında azalma saptanmıştır (170). Çalışmada fareler standart fare yemi ile beslenmiştir ve içme suyu olarak çeşme suyu verilmiştir.

Bununla birlikte aşırı fruktoz alımı ile birlikte PCOS'ta görülme sıklığı yüksek olan insülin direnci oluşmaktadır (20). Artmış insülin seviyesi ovaryumdaki steroidogenezi uyararak, teka hücreleri tarafından aşırı androjen üretilmesine neden olmaktadır (21). Bu mekanizmanın ovaryumun yumurta üretme kapasitesi üzerinde olumsuz etkisi vardır (171). Ovaryan hiperandrojenizm, erken folliküler atreziye ve bunun sonucunda oligo-/anovulasyona neden olmaktadır (9, 22, 23). Gelişen over

disfonksiyonu; oligoamenore veya amenore gibi menstruasyon bozuklukları ile kendini göstermektedir (171).

Uzun süre yüksek fruktoz ile beslenme erkek sıçanlarda kilo artışına neden olurken, dişi sıçanlarda bu etki görülmemektedir (172). Biz de çalışmamızda fruktozun kilo alımı üzerine etkisine baktığımızda, kilo alma konusunda etkisinin olmadığını gördük. Fruktoz ile beslenen hayvanların ağırlıkları, kontrol grubuna göre daha düşük ölçüldü. Diyabetin oluşmuş olması ve oral gavajın yaratmış olduğu stres, daha düşük ağırlığa sahip olmalarının nedeni olarak gösterilebilmektedir.

PCOS'ta foliküler gelişimdeki duraksama ile anovulasyon ve küçük antral foliküllerin ovaryum periferinde birikimine bağlı olarak, ovaryumun polikistik morfolojisi göze çarpmaktadır (173). Yaptığımız morfolojik değerlendirmelerde de, ovaryum korteksinde artan preantral ve antral foliküller dikkat çekmekteydi. Fazla miktardaki LH stimülasyonu ile teka hücrelerinde aşırı androstenedion üretilmeye başlanmakta ve teka tabakasında kalınlaşma meydana geldiği belirlenmiştir (107). Çalışmamızda gruplar arasındaki teka hücre tabakası kalınlığına bakıldığında, artan androjen sentezine paralel olarak kalınlaşma tespit edildi, fakat sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

PAT proteinleri tip 2 diyabetes mellitus ve obezite ile ilişkilendirilmektedir (27). PAT protein ailesi üyeleri olan PLIN2 ve PLIN3 oositler de dahil birçok hücrede küçük lipit dropletlerin üzerinde bulunmaktadır (142). Yapılan çalışmalarda %30 fruktoz ile beslenen farelerde PLIN2 ekspresyonunun up-regüle olduğu bildirilmektedir (19). PLIN2, gonadotropinlerin preovulatuvar foliküllerin granüloza hücrelerinde, regüle ettiği bir proteindir (142). Non adipoz hücrelerde PLIN2 ekspresyonu hücre içi lipit metabolizması değişiklikleri ile yakından ilişkilidir. Eksojen serbest yağ asitleri hücre içerisinde PLIN2'nin iki yol üzerinden artmasına neden olmaktadır. Bu gen transkripsiyonunu aktive ederek ve TAG sentezini uyararak olmaktadır (27).

MII aşamasındaki oositte PLIN2 ekspresyonunun GV aşamasındaki oosite göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir (30). Yapılan IVM çalışmalarında ise PLIN2 ekspresyonu sabit kalırken, PLIN3 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (28-30).

Çalışmamızda % 20 fruktoz verilen grupta PLIN2'nin en fazla eksprese olduğu gelişim safhası primer folikül aşaması iken, kontrol grubunda ise preantral folikül aşamasıdır. Bu sonuç bize gelişmeye başlayan foliküllerde enerji rezervlerinin kontrol grubuna göre daha çabuk azaldığını düşündürmektedir. Kontrol grubu ovaryumunda PLIN3 miktarı gelişim süresince artış gösterirken, fruktoz ile beslenen grupta primordiyal folikül aşamasında yüksek olan ekspresyon, gelişim süresince azalış sergilemektedir. Hormon grubu preantral folikül oositinde ise HF-1 grubuna göre daha fazla PLIN2 ekspresyonu mevcuttur. Bu sonuç bize fruktoz ile beslenmede TG depolarının ani tükenmesinin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Yüksek fruktoz ile beslenmede PLIN3 miktarı primer folikül aşamasında artış göstermektedir. Yüksek fruktoz ile beslenen gruptaki ani PLIN2 ve PLIN3 değişiklikleri bize, enerji metabolizmasında dengesizliklere neden olarak, ovaryumda patolojik sonuçların oluşmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ancak daha ileri çalışmalar ile oosit kalitesinin ve fertilizasyon yeterliliğinin olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.

PCOS'lu hastalarda yapılan çalışmalarda, derialtı yağ dokusunda PLIN1, PLIN3 ve PLIN5'in kontrol grubuna göre % 90 daha az eksprese olduğu; PLIN2 ve PLIN4'ün ise kontrol grubuna göre 3 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır (174). Yaptığımız western blot yönteminin sonuçlarına göre % 20 fruktoz ile beslenen ve hormon grubu ovaryumlarında PLIN2 miktarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olması PLIN2'nin fruktoz ile beslenme sonucu up-regüle olduğu bulgusu ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte PLIN2 ekspresyonu PLIN3 ile ilişkilidir. PLIN2 eksojen oleat yokluğunda amino terminal ucu ile PLIN3'ün lipid damlacığının yüzeyinden ayrılmasına neden olmaktadır (152). Fazla fruktoz alımı ile birlikte artan TG ve LD'lere paralel olarak, western blot sonucuna göre ovaryum dokusunda PLIN3 miktarı da artmaktadır.

PCOS oluşumunda beynin hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH hormonları etkilidir. Yaptığımız çalışmada serum LH seviyesinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. LH hormonu ovaryumda androjen üretimini arttırmakta, androjenler yağ dokusu tarafından E2'ye dönüştürülmektedir. Çalışmamızda serum E2 seviyesi yine diğer üç grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ovaryumda artan E2, LH salınımını uyararak, LH'nin daha da artmasına neden olmaktadır. LH salgısının yükselmesi ile birlikte bir kısır döngü meydana gelmekte ve ovulasyon gerçekleşmemektedir. Serum progesteron seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük olması, korpus luteum yapılarının daha az olmasından kaynaklanmaktadır. PCOS'lu kadınlarda aromataz aktivitesinin artması ile birlikte E2 ve progesteron hormon seviyelerinde de artış izlenmektedir (175). Aromataz aktivitesindeki artış, insuline bağımlı ikincil olarak olabilmektedir. İnsulin gonadotropinler'den hem bağımsız olarak, hem de etkileşerek E2 ve progesteron üretimini stimüle edebilmektedir (176, 177).

Özellikle çalışmamızda hormon grubunda bu bulguların istatistiksel olarak anlamlı olmaması, juvenil dönemden itibaren DHEA'nın verilmemiş olmasından kaynaklanabileceğini düşündürdü. Bununla birlikte düşük progesteron salgısı endometriyal fonksiyonu ve embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (178).

Yüksek karbonhidrat içerikli diyet ile beslenme oksidatif stresi (OS) de arttırmaktadır. OS ise çeşitli kronik hastalıkların başlamasına neden olmaktadır (179). OS insülin direncinin artmasına ve hiperandrojenemiye neden olmaktadır (180, 181). PCOS'lu hastalarda mitokondriyal disfonksiyon ve artmış reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi mevcuttur (181-183). Perilipinlerin mitokondriyal oksidatif kapasiteyi etkileyebileceği düşünülmüştür (184). Bu çalışmada OS belirteçlerine bakılmamıştır.

Sonuç olarak juvenil dönemde yüksek fruktoz tüketiminin, ovaryumda patolojik durumların ortaya çıkmasına katkı sağlayabileceği görülmektedir. Oral gavaj ile verilen fruktoz miktarı sınırlıdır. Fruktozun daha uzun süreli ve ad libidum verilmesinin PCOS tablosunun oluşmasında daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

PLIN2 ve PLIN3 proteinlerinin total ovaryum dokusunda miktarlarında artış gözlenirken, foliküler düzeyde anlamlı farklılığın bulunmadığı tespit edildi. PAT proteinlerinden PLIN2 ve PLIN3'ün bu oluşumdaki direkt rolleri tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte, kontrol grubuna göre daha fazla bulunmaları, bu oluşumun bir parçası olabileceklerini göstermektedir.



8.KAYNAKLAR

- 1.Wang H et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem.* 286 (18); 15707-15, 2011
- 2.Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 40 (5); 325-438, 2001
- 3.Thiele C, Spandl J. Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol.* 20 (4); 378-85, 2008
- 4.Walther TC, Farese RV, Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta.* 1791 (6); 459-66, 2009
- 5.Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans.* 31 (Pt 6); 1120-4, 2003
- 6.Khor VK, Shen WJ, Kraemer FB. Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16 (6); 632-7, 2013
- 7.Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 352 (12); 1223-36, 2005
- 8.Melo AS et al. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. *Hum Reprod.* 25 (8); 2124-31, 2010
- 9.Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 370 (9588); 685-97, 2007
- 10.Franks S. Polycystic Ovary Syndrome. *New England Journal of Medicine.* 333 (13); 853-61, 1995

- 11.**Knochenhauer ES et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 83 (9); 3078-82, 1998
- 12.**Diamanti-Kandarakis E et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 84 (11); 4006-11, 1999
- 13.**Asuncion M et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab.* 85 (7); 2434-8, 2000
- 14.**Jaquet D et al. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia.* 48 (5); 849-55, 2005
- 15.**Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction.* 124 (5); 675-81, 2002
- 16.**Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab (Lond).* 9 (1); 89, 2012
- 17.**Feinman RD, Fine EJ. Fructose in perspective. *Nutr Metab (Lond).* 10 (1); 45, 2013
- 18.**Parks EJ, Skokan LE, Timlin MT, Dingfelder CS. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J Nutr.* 138 (6); 1039-46, 2008
- 19.**Liu X et al. Activation of farnesoid X receptor (FXR) protects against fructose-induced liver steatosis via inflammatory inhibition and ADRP reduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 450 (1); 117-23, 2014

- 20.**Lecoultre V et al. Effects of fructose and glucose overfeeding on hepatic insulin sensitivity and intrahepatic lipids in healthy humans. *Obesity (Silver Spring)*. 21 (4); 782-5, 2013
- 21.**Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 18 (6); 774-800, 1997
- 22.**Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM, Ruokonen A, Tapanainen JS. Insulin sensitivity, insulin secretion, and metabolic and hormonal parameters in healthy women and women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 15 (6); 1266-74, 2000
- 23.**Pasquali R, Gambineri A. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reprod Biomed Online*. 12 (5); 542-51, 2006
- 24.**Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 79 (4); 537-43, 2004
- 25.**Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med*. 10 (7); 160, 2008
- 26.**Storey ML, Forshee RA, Anderson PA. Beverage consumption in the US population. *J Am Diet Assoc*. 106 (12); 1992-2000, 2006
- 27.**Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*. 1791 (6); 419-40, 2009
- 28.**Sastre D et al. Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology*. 81 (2); 326-31, 2014

- 29.**Yang X et al. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 22 (8); 1262-71, 2010
- 30.**Zhang RN et al. Expression of Perilipin 2 (PLIN2) in Porcine Oocytes During Maturation. *Reproduction in Domestic Animals*. 49 (5); 875-80, 2014
- 31.**Monk M, McLaren A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *J Embryol Exp Morphol*. 63 75-84, 1981
- 32.**Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest*. 120 (4); 963-72, 2010
- 33.**Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*. 44 (12); 622-32, 2006
- 34.**McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol*. 163 (1-2); 3-9, 2000
- 35.**Gondos B. Germ cell degeneration and intercellular bridges in the human fetal ovary. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 138 (1); 23-30, 1973
- 36.**Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*. 7 (10); 1342-6, 1992
- 37.**Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat (Basel)*. 14 (1-2); 108-23, 1952
- 38.**Baker TG. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 158 417-33, 1963

- 39.**Kezele P, Nilsson E, Skinner MK. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci.* 7 d1990-6, 2002
- 40.**Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev.* 66 (1); 71-117, 1986
- 41.**Guigon CJ, Magre S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod.* 74 (3); 450-8, 2006
- 42.**Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124 43-101, 1991
- 43.**Odor DL, Blandau RJ. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. *Am J Anat.* 124 (2); 163-86, 1969
- 44.**Mazaud S et al. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Dev Biol.* 277 (2); 403-16, 2005
- 45.**Sawyer HR et al. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod.* 66 (4); 1134-50, 2002
- 46.**Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res.* 24 495-507, 1961
- 47.**Yıldırım M, Resimli SistematiK Anatomi,1. Baskı, İstanbul;Nobel Tıp Kitabevleri.2013
- 48.**Fritsch H,Kuehnel W. Color Atlas of Human Anatomy (Vol.2) Internal Organs. İnsan Anatomisi Renkli Atlas ve Temel Kitabı/ İç Organlar. 1. Baskı,Kopuz C,

İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 2013.

49.Mescher AL, Junqueiras Basic Histology Text and Atlas 13th Edition, in McGraw-Hill Education/; United States/; 2013

50.Histopages T, Atlas of Laboratory Mouse Histology, in Texas Histopages/; <http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/femaleu/mousedidiagram.html>, 2004

51.Piper M. Treuting SMD, Charles W. Frevert, Denny Liggitt, Kathleen S. Montine, Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas, in ELSEVIER/; USA/; 2012

52.Ross MH,Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. baskı,Çeviren: Baykal B, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., Ankara, 2014.

53.Kierszenbaum AL,Histology and Cell Biology. Histoloji ve Hücre biyolojisi. Çeviren: Demir R, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., Ankara, 2006.

54.Williams CJ, Erickson GF, Morphology and Physiology of the Ovary, in Endotext, De Groot LJ et al, De Groot LJ et alDe Groot LJ et als, South Dartmouth (MA). p. 2000.

55.Reynolds SR. The vasculature of ovary and ovarian function. Omnia Med. 28 (10-12); 456-7, 1950

56.Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. Horm Res. 37 Suppl 1 5-11, 1992

57. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (11); 3748-51, 1997
58. Bachvarova R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev Biol (N Y)* 1985. 1 453-524, 1985
59. Wassarman PM, Liu C, Litscher ES. Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J Cell Sci.* 109 (Pt 8) 2001-4, 1996
60. McPherron AC, Lee SJ. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem.* 268 (5); 3444-9, 1993
61. Dong J et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383 (6600); 531-5, 1996
62. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev.* 6 (3); 371-99, 1985
63. Hsueh AJ, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 15 (6); 707-24, 1994
64. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17 (2); 121-55, 1996
65. McNatty KP. Hormonal correlates of follicular development in the human ovary. *Aust J Biol Sci.* 34 (3); 249-68, 1981
66. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1 (2); 81-7, 1986

67. Gougeon A, Lefevre B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil.* 69 (2); 497-502, 1983
68. McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 49 (6); 851-60, 1979
69. Welt CK et al. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (8); 2645-52, 1997
70. M F, *The Hypothalamic-Hypophyseal-Ovarian Axis and the Menstrual Cycle*, Vol 5, Chapter 6, *Gynecology and Obstetrics*. 2002
71. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH, Larsen's *Human Embryology*, in Fourth Edition/, Churchill Livingstone, Elsevier Inc./; Philadelphia/; 2009
72. Conti M et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 187 (1-2); 153-9, 2002
73. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 29 (2); 181-91, 1935
74. Azziz R, Adashi EY. Stein and Leventhal: 80 years on. *Am J Obstet Gynecol.* 214 (2); 247 e1- e11, 2016
75. Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH. Early origins of polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Dev.* 17 (3); 349-60, 2005

76. Dunaif A et al. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 41 (10); 1257-66, 1992
77. Hardy K et al. Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod*. 10 (8); 2125-35, 1995
78. Heijnen EM et al. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 12 (1); 13-21, 2006
79. Urman B et al. The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. *Fertil Steril*. 57 (6); 1269-73, 1992
80. Sengoku K et al. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 12 (3); 474-7, 1997
81. Ludwig M, Finas DF, al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod*. 14 (2); 354-8, 1999
82. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA. 5alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 84 (7); 2414-8, 1999
83. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*. 63 (1); 39-48, 2008
84. Agarwal SK, Judd HL, Magoffin DA. A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 81 (10); 3686-91, 1996

- 85.**Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 28 (2); 361-78, 1999
- 86.**Willis DS et al. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 83 (11); 3984-91, 1998
- 87.**Filho FLT et al. Aberrant Expression of Growth Differentiation Factor-9 in Oocytes of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 87 (3); 1337-44, 2002
- 88.**Stubbs SA et al. Anti-mullerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (10); 5536-43, 2005
- 89.**Azziz R et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 91 (11); 4237-45, 2006
- 90.**Azziz R. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab.* 91 (3); 781-5, 2006
- 91.**Rotterdam EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 81 (1); 19-25, 2004
- 92.**Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 30 (4); 459-70, 1989

- 93.**Balen AH et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod.* 10 (8); 2107-11, 1995
- 94.**Chang WY, Knochenhauer ES, Bartolucci AA, Azziz R. Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertil Steril.* 83 (6); 1717-23, 2005
- 95.**Mathur RS, Moody LO, Landgrebe S, Williamson HO. Plasma androgens and sex hormone-binding globulin in the evaluation of hirsute females. *Fertil Steril.* 35 (1); 29-35, 1981
- 96.**Miller KK et al. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (2); 525-33, 2004
- 97.**Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 84 (10); 3666-72, 1999
- 98.**Dumesic DA et al. Reduced intrafollicular androstenedione and estradiol levels in early-treated prenatally androgenized female rhesus monkeys receiving follicle-stimulating hormone therapy for in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 69 (4); 1213-9, 2003
- 99.**<https://courses.washington.edu/conj/bess/reproductive/pcos.htm>, 09.11.2016
- 100.**Alexander CJ, Tangchitnob EP, Lepor NE. Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Rev Obstet Gynecol.* 2 (4); 232-9, 2009
- 101.**Rebar R et al. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest.* 57 (5); 1320-9, 1976

- 102.**Lanzone A et al. Corticotropin-releasing hormone induces an exaggerated response of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 63 (6); 1195-9, 1995
- 103.**Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 12 (4); 351-61, 2006
- 104.**Hahn S et al. Clinical and biochemical characterization of women with polycystic ovary syndrome in North Rhine-Westphalia. *Horm Metab Res.* 37 (7); 438-44, 2005
- 105.**Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf).* 62 (6); 644-9, 2005
- 106.**Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarache and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (23); 10619-23, 1995
- 107.**Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 79 (4); 1158-65, 1994
- 108.**Dumesic DA et al. Ovarian morphology and serum hormone markers as predictors of ovarian follicle recruitment by gonadotropins for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (6); 2538-43, 2001
- 109.**Jonard S et al. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod.* 18 (3); 598-603, 2003

- 110.**Rice S, Ojha K, Whitehead S, Mason H. Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Mullerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 92 (3); 1034-40, 2007
- 111.**Phy JL et al. Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (7); 3561-6, 2004
- 112.**Samoto T et al. Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endocr J.* 40 (6); 715-26, 1993
- 113.**Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 192 (1-2); 37-43, 2002
- 114.**Franks S, Mason H, Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 163 (1-2); 49-52, 2000
- 115.**Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin. *Biol Reprod.* 59 (6); 1445-53, 1998
- 116.**Balen AC, GS.; Homburg, R.; Legro, RS. *Polycystic Ovary Syndrome –A Guide to Clinical Management.* Taylor and Francis;London. 2005
- 117.**Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 100 (1-2); 51-4, 1994
- 118.**Arici A HR, Steroidogenesis, JJ S.Vol. Vol 5, Chapter 1,Gynecology and Obstetrics;Gynecology and Obstetrics.2002

- 119.**Gervasio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sa MF, Rosa ESAC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstet Gynecol.* 2014 818010, 2014
- 120.**Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 90 (1); 23-46, 2010
- 121.**Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr.* 58 (5 Suppl); 724S-32S, 1993
- 122.**Rumessen JJ. Fructose and related food carbohydrates. Sources, intake, absorption, and clinical implications. *Scand J Gastroenterol.* 27 (10); 819-28, 1992
- 123.**Putkonen L, Yao CK, Gibson PR. Fructose malabsorption syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16 (4); 473-7, 2013
- 124.**Gaby AR. Adverse effects of dietary fructose. *Altern Med Rev.* 10 (4); 294-306, 2005
- 125.**Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sanchez-Lozada LG. Dietary fructose and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 13 (1); 29-35, 2011
- 126.**Johnson RJ et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev.* 30 (1); 96-116, 2009
- 127.**Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 76 (5); 911-22, 2002
- 128.**Glushakova O et al. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 19 (9); 1712-20, 2008
- 129.**DeBosch BJ, Chi M, Moley KH. Glucose transporter 8 (GLUT8) regulates enterocyte fructose transport and global mammalian fructose utilization. *Endocrinology.* 153 (9); 4181-91, 2012

130.Mate A, de la Hermosa MA, Barfull A, Planas JM, Vazquez CM. Characterization of D-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: changes in hypertensive rats. *Cell Mol Life Sci.* 58 (12-13); 1961-7, 2001

131.<http://www.worldofcorn.com/#high-fructose-corn-syrup-usage>, 09.11.2016

132.Bartz R et al. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res.* 6 (8); 3256-65, 2007

133.Beller M et al. Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Mol Cell Proteomics.* 5 (6); 1082-94, 2006

134.Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 279 (45); 46835-42, 2004

135.Liu P et al. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 279 (5); 3787-92, 2004

136.Sato S et al. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J Biochem.* 139 (5); 921-30, 2006

137.Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 21 (1); 167-78, 2007

138.Miura S et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem.* 277 (35); 32253-7, 2002

- 139.**Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Londos C. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem.* 265 (31); 18769-75, 1990
- 140.**Greenberg AS et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem.* 266 (17); 11341-6, 1991
- 141.**Greenberg AS et al. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (24); 12035-9, 1993
- 142.**Brasaemle DL et al. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res.* 38 (11); 2249-63, 1997
- 143.**Jiang HP, Harris SE, Serrero G. Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth Differ.* 3 (1); 21-30, 1992
- 144.**Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (17); 7856-60, 1992
- 145.**Xu G et al. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem.* 280 (52); 42841-7, 2005
- 146.**Gross DN et al. Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin. *Mol Endocrinol.* 20 (2); 459-66, 2006

- 147.** Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294 (2); 309-21, 1998
- 148.** Tansey JT et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (11); 6494-9, 2001
- 149.** Martinez-Botas J et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet.* 26 (4); 474-9, 2000
- 150.** Yamaguchi T, Omatsu N, Omukae A, Osumi T. Analysis of interaction partners for perilipin and ADRP on lipid droplets. *Mol Cell Biochem.* 284 (1-2); 167-73, 2006
- 151.** Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res.* 48 (12); 2751-61, 2007
- 152.** Orlicky DJ et al. Multiple functions encoded by the N-terminal PAT domain of adipophilin. *J Cell Sci.* 121 (Pt 17); 2921-9, 2008
- 153.** Magnusson B et al. Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (7); 1566-71, 2006
- 154.** Sztalryd C et al. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. *J Biol Chem.* 281 (45); 34341-8, 2006

- 155.**Edvardsson U et al. PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *J Lipid Res.* 47 (2); 329-40, 2006
- 156.**Schmuth M et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 122 (4); 971-83, 2004
- 157.**Gao J, Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J Cell Physiol.* 182 (2); 297-302, 2000
- 158.**Bildirici I et al. The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (12); 6056-62, 2003
- 159.**Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes. *Biochem J.* 330 (Pt 2) 803-9, 1998
- 160.**Heid HW, Schnolzer M, Keenan TW. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem J.* 320 (Pt 3) 1025-30, 1996
- 161.**Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem.* 276 (7); 5101-8, 2001
- 162.**Dalen KT et al. Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes.* 53 (5); 1243-52, 2004

- 163.**Diaz E, Pfeffer SR. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell*. 93 (3); 433-43, 1998
- 164.**Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett*. 580 (23); 5484-91, 2006
- 165.**Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 48 (12); 2547-59, 2007
- 166.**de Zegher F, Ibanez L. Prenatal growth restraint followed by catch-up of weight: a hyperinsulinemic pathway to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 86 Suppl 1 S4-5, 2006
- 167.**Galluzzo A, Amato MC, Giordano C. Insulin resistance and polycystic ovary syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 18 (7); 511-8, 2008
- 168.**de Melo AS et al. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. *Reproduction*. 150 (1); R11-24, 2015
- 169.**Diamanti-Kandarakis E, Kandarakis H, Legro RS. The role of genes and environment in the etiology of PCOS. *Endocrine*. 30 (1); 19-26, 2006
- 170.**Ackerman Z et al. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*. 45 (5); 1012-8, 2005
- 171.**Franks S. Genetic and environmental origins of obesity relevant to reproduction. *Reprod Biomed Online*. 12 (5); 526-31, 2006
- 172.**Pektas MB, Sadi G, Akar F. Long-Term Dietary Fructose Causes Gender-Different Metabolic and Vascular Dysfunction in Rats: Modulatory Effects of Resveratrol. *Cell Physiol Biochem*. 37 (4); 1407-20, 2015

173.Maciel GA et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (11); 5321-7, 2004

174.Covington JD et al. Potential effects of aerobic exercise on the expression of perilipin 3 in the adipose tissue of women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Eur J Endocrinol.* 172 (1); 47-58, 2015

175.van der Spuy ZM, Dyer SJ. The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 18 (5); 755-71, 2004

176.Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 81 (1); 302-9, 1996

177.Barnes RB. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: lessons from ovarian stimulation studies. *J Endocrinol Invest.* 21 (9); 567-79, 1998

178.Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci.* 60-61 535-47, 2000

179.Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 148 183-93, 2016

180.Costello MF, Shrestha B, Eden J, Johnson NP, Sjoblom P. Metformin versus oral contraceptive pill in polycystic ovary syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 22 (5); 1200-9, 2007

181.Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 10 49, 2012

182.Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Gallova Z, Badia R, Martinez P. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clin Exp Immunol.* 144 (2); 217-22, 2006

183.Victor VM et al. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 96 (10); 3115-22, 2011

184.Wang C et al. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology.* 61 (3); 870-82, 2015



9.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



E-İmralıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.2562
Konu : Etik Kurulu Kararı

02/10/2015

Sayın Yrd. Doç. Dr. İlknur Keskin

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Juvenil Dönemde Yüksek Fruktoz içerikli Diyetle Beslenmenin Perilipin Ekspresyonu Üzerinden Polikistik Over Sendromu Gelişimi İle İlişkisi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
30/09/2015	76		Yrd. Doç. Dr. İlknur Keskin

“Juvenil Dönemde Yüksek Fruktoz içerikli Diyetle Beslenmenin Perilipin Ekspresyonu Üzerinden Polikistik Over Sendromu Gelişimi İle İlişkisi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
..
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nejda	Soyadı	Bedri
------------	-------	---------------	-------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	Devam
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2005
Lise	Sefaköy Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Biyolog	Avcılar Anadolu Hastanesi	2013-2014
Biyolog	Özel İstanbul Hospital	2007-2012
Biyolog	Özel Sadık Ahmet Hastanesi	2006-2007

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama *	Konuşma *	Yazma *
İngilizce	Orta	Orta	Orta
Bulgarca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	59,12791	57,63192	57,41863

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi derecede
SPSS	Orta derecede

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	11.2014
Ondokuz Mayıs Üniversitesi	4. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi	07.10.2015-09.10.2015
Selçuk Üniversitesi	13. Ulusal Sinirbilim Kongresi	30.04.2015-03.05.2015
Selçuk Üniversitesi	Uygulamalı Western Blotting Kursu	30.04.2015-03.05.2015
Selçuk Üniversitesi	Tıbbi İstatistik Temel Uygulamaları Kursu	30.04.2015-03.05.2015
İstanbul Medipol Üniversitesi	Sağlık Bilimlerinde Etkin ve Multidisipliner Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi	06.03.2015-08.03.2015
THED-İstanbul Medipol Üniversitesi	Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Etkinliği	19.12.2014-21.12.2014

Yayın ve Bildiriler

1. İlknur Keskin, Nejda Bedri. Yüksek Fruktoz İçerikli Beslenmenin Overlerde Perilipin Ekspresyonu ve Polikistik Over Gelişimi ile İlişkisi. Zeynep Kamil Tıp Bülteni. DOI: 10.16948/zktipb.257211
2. İlknur Keskin, Turan Demircan, Nejda Bedri, Nadiye Köroğlu. Fare Östrus Siklusu'nun Farklı Fazlarında PLIN2 ve PLIN3 Ekspresyonu. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi. 2016/647, 2016;56(3)
3. Mehmet Yalçın Günal, Şule Ayla, Mehmet Ozansoy, Nejda Bedri, İsmail Aslan, Cenk Ersavaş, Muzaffer Beyza Çetin Ozansoy, Erdem Yeşilada, Ertuğrul Kılıç. Eksizyonel Yara Modelinde, Farklı Konsantrasyonlardaki Resveratrol'ün Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkileri. Ufk2016. PS033
4. İlknur Keskin, Nejda Bedri, Tangül Müdok. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dallarında Yapılan Tıpta Uzmanlık ve Doktora Tezlerinin Genel Profili. Uhek2016. P238