

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT FSH'NİN IVF TEDAVİSİ UYGULANAN POLİKİSTİK OVER  
SENDROMU HASTALARININ FOLLİKÜL SIVILARINDAN ELDE EDİLEN  
GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE KONNEKSİN 43 ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Ramin HASHEMIHESAR

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2017

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

**REKOMBİNANT FSH'NİN IVF TEDAVİSİ UYGULANAN POLİKİSTİK OVER  
SENDROMU HASTALARININ FOLLİKÜL SIVILARINDAN ELDE EDİLEN  
GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE KONNEKSİN 43 ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Ramin HASHEMIHESAR**

**HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**  
**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Lale KARAKOÇ SÖKMENSÜER**

**ANKARA**  
**2017**

**Rekombinant Fsh'nın Ivf Tedavisi Uygulanan Polikistik Over Sendromu  
Hastalarının Follikül Sıvılarından Elde Edilen Granüloza Hücrelerinde Konneksin 43  
Üzerine Etkisi**

**Dr. Ramin HASHEMIHESAR**

Bu çalışma 20.11.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Histoloji – Embriyoloji Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof.Dr. Fevziye Figen KAYMAZ*  
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi) 
- Tez Danışmanı:** *Prof.Dr. Lale KARAKOÇ SÖKMENSÜER*  
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi) 
- Üye:** *Prof.Dr. Ayşe Nur ÇAKAR*   
(TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi)
- Üye:** *Prof.Dr. Atilla DAĞDEVİREN*   
(Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi)
- Üye:** *Prof. Dr. Sevda Fatma MÜFTÜOĞLU*  
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi) 

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

Tarih **20 Kasım 2017**



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- x **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**  
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- o **Tezimin/Raporumun .....tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**  
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- o **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**



20/11/2017

Dr. Ramin HASHEMIHESAR

**ETİK BEYAN**

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

**Dr. Ramin HASHEMIHESAR**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince daima bilimsel destek veren, yol gösterici olan ve bana özgür bir entellektüel ortam sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Lale KARAKOÇ SÖKMENSÜER'e teşekkür ederim.

Ayrıca Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Ünitesi'nde bana destek veren tüm hocalarım, uzman ve asistan arkadaşlarıma ve tüm personele teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman yanımda olan ve bana destek olan eşim Shahrouz MORTAZAVI'e teşekkür ederim.

Bu tezi destekleyen Hacettepe BAB'a teşekkür ederim.

## ÖZET

**Hashemihesar, R., Rekombinant FSH'nın IVF Tedavisi Uygulanan Polikistik Over Sendromu Hastalarının Follikül Sıvılarından Elde Edilen Granüloza Hücrelerinde Konneksin 43 Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji – Embriyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017.** Projede amacımız infertilite nedeni ile başvuran Poli-Kistik Over (PKOS) hastalarından OPU (ovum pick up) sırasında elde edilen follikül sıvılarından oosit-kumulus kompleksi seçildikten sonra arda kalan follikül sıvılarından elde edilen granüloza hücrelerine recombinant follikül stimüle edici faktör (rFSH)'ü Anti Mullerian Hormone Reseptör-II (AMHR2) antikorumun varlığında ve yokluğunda, uygulamak ve rFSH etkisini konneksin 43 (Cx43) üzerinde incelemektir. Tüp Bebek Ünitesi'ne infertilite nedeni ile başvuran 10 PKOS hastasından OPU sırasında elde edilen follikül sıvılarından oosit-kumulus kompleksi seçildikten sonra arda kalan follikül sıvılarından granüloza hücreleri alınarak 4 alt gruba ayrılmıştır. Farklı kombinasyonlarda 2 saat' lik kültür sonrası bu gruplarda immünofluresan yöntemiyle Cx43 değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışmada hem Cx43 boyanma oranı ve hemde şiddeti açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Kontrol ve FSH verilen grup arasında ( $P=0,011$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0,001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. FSH ve AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0,026$ ) anlamlı fark bulunmuştur. AMHR2 ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0,002$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0,001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. AMHR2 ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0,001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Sonuç olarak elde edilen bu veriler, rFSH'nın PKOS hastalarında granüloza hücreleri üzerine etki ettiği ve Cx43 ekspresyonunu arttırarak, granüloza hücreleri arasındaki iletişimi arttırdığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** polikistik over sendromu, granüloza hücre, infertilite

THD-2017-11593 no'lu proje kapsamında Hacettepe BAB tarafından desteklenmiştir.

**ABSTRACT**

**Hashemihesar, R., Effect of Recombinant Follicle Stimulating Hormone (FSH) on Connexin 43 Activity of Granulosa Cells of Patients with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Hacettepe University Institute of Health Sciences Histology – Embryology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017.** The aim of this project is to investigate the effect of recombinant FSH (rFSH) on Connexin 43 (Cx43) activity of granulosa cells, that will be collected from the follicular fluids following isolation of the cumulus-oocyte complexes, with or without Anti Mullerian Hormone Receptor-II (AMHR2) antibody. After selecting oocyte-cumulus complex from the follicular fluid obtained during the OPU from 10 PCOS patients who referred to the IVF treatment for infertility, the granulosa cells were separated from the remaining follicular fluids and divided into 4 subgroups. After 2 hours culture in different combinations, Cx43 was evaluated by immunofluorescence staining in these groups. In this study, there were significant differences between the groups in terms of Cx43 staining rate and score. Significant differences were found between control and FSH group ( $P=0.011$ ). We found significant differences between control and FSH+AMHR2 treated group ( $P=0.001$ ). There was also significant difference between FSH and AMHR2 group ( $P=0.026$ ). A significant difference was found between AMHR2 and FSH+AMHR2 treated group ( $P=0.002$ ). Significant differences were found between control and FSH+AMHR2 treated group ( $P=0.001$ ). A significant difference was found between AMHR2 and FSH+AMHR2 treated group ( $P=0.001$ ). The result shows that rFSH affects the granulosa cells in PCOS patients and increases the expression of Cx43, thus enhancing the communication between the granulosa cells.

**Key Words:** polycystic ovary syndrome, granulosa cells, infertility

It was supported by Hacettepe SRPCU under the project number THD-2017-11593.



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Poli-Kistik Over Sendromu	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. PKOS Mekanizmaları ve Patofizyolojisi	3
2.2. Konneksinler	7
2.2.1. Oogenez İle İlişkili Konneksinler	8
2.2.2. Konneksin 43	9
2.3. Granüloza Hücreleri	9
2.4. Pre-Antral Follikül Gelişiminde Androjenler-FSH-AMH Etkileşimleri	
('Gonadotropin Bağımsız' Follikül Büyümesi)	10
2.4.1. Androjenlerin Rolü	10
2.4.2. FSH'nın Rolü	10
2.4.3. AMH'nin Rolü	12
2.4.4. AMH, FSH ve Androjenler Arasındaki Etkileşimler	12
2.5. Antral Follikül Gelişiminde FSH-AMH-Östradiol Etkileşimleri	
('Gonadotropin Bağımlı' Follikül Büyümesi)	15
2.5.1. Aromataz Ekspresyonu	15

2.5.2. FSH-Aromataz İlişkisi	15
2.5.3. AMH- FSH Kaynaklı Aromataz Aktivitesi İlişkisi	16
2.5.4. Östradiol-AMH İlişkisi	16
2.6. Androjen'den Östrojen Bağımlı Foliküllere Geçiş	18
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	19
3.1. Etik Kurul İzin Süreci	19
3.2. Örneklerin Elde Edilmesi	19
3.2.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hastalar	19
3.2.2. Araştırmaya Almama Kriterleri	19
3.3. Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu	19
3.4. Hücre Sayımı	20
3.5. Hücrelerin Dondurulması	20
3.6. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	20
3.7. Besiyerlerin Hazırlanması	20
3.8. Deney Grupları	21
3.9. Hücre Kültürü	21
3.10. İmmünofluresan Yöntemiyle Cx43 Değerlendirilmesi	22
3.10.1. Hücrelerin Fiksasyonu	22
3.10.2. Permeabilizasyon	22
3.10.3. Serum Blokajı	22
3.10.4. Primer Antikor Uygulaması	22
3.10.5. FITC Konjuge Sekonder Antikor Uygulaması	22
3.10.6. Çekirdek Boyası	23
3.10.7. Görüntüleme	23
3.11. Mikrografların Değerlendirilmesi	23
3.12. İstatistik Analiz	25
<b>4. BULGULAR</b>	26
4.1. Kontrol Gruplarındaki Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu	39
4.2. FSH Varlığında Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu	31
4.3. AMHR2 Ab Varlığında Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu	33

4.4. FSH ve AMHR2 Ab Varlığında Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu	35
<b>5. TARTIŞMA</b>	38
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	40
<b>7. KAYNAKLAR</b>	41
<b>8. EKLER</b>	
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AMH</b>	Anti Mülleriyan Hormon
<b>AMHR2</b>	Anti Mülleriyan Hormon Reseptör-II
<b>Ab</b>	Antibody
<b>AR</b>	Androjen Reseptoru
<b>BMP</b>	Kemik Morfogenik Proteinleri
<b>CRE</b>	cAMP Response Element
<b>CREB</b>	cAMP Response Element Binding Protein
<b>Cx</b>	Connexin
<b>DAPI</b>	4,6-Diamino-2-Phenylindole, Dilactate
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxide
<b>E2</b>	Estradiol
<b>ER</b>	Östrojen Reseptörü
<b>FBS</b>	Fetal Bovin Serum
<b>FS</b>	Folikül Sıvısı
<b>FSH</b>	Folikül Stimüle edici Hormon
<b>GDF</b>	Büyüme ve Farklılaşma Faktörü-9
<b>HÜTF</b>	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>IGF1</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
<b>IRS-2</b>	İnsülin Reseptörü Substratı-2
<b>LH</b>	Luteinize edici Hormon
<b>LIF</b>	Leukemia İnhibe Edici Faktör
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>OHSS</b>	Ovarian Hyperstimulation Syndrome
<b>OPU</b>	Ovum Pick Up
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCOM</b>	Polikistik Over Morfoloji
<b>PKOS</b>	Poli-Kistik Over Sendromu

<b>rFSH</b>	Rekombinant Follikül Stimüle edici Hormon
<b>SHBG</b>	Sex Hormone-Binding Globulin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor Beta

**ŞEKİLLER**

<b>Şekil</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	x40 objektif kullanılarak çekilen mikrografta insan granüloza hücrelerinde intensite ölçümü	24
<b>4.1.</b>	x63 objektifte çekilen mikrografta Cx43 negatif (A) ve pozitif (B) normal insan granüloza hücrelerinde	26
<b>4.2.</b>	x40 objektifle çekilen farklı gruplarda granüloza hücreleri	27
<b>4.3.</b>	Deney ve kontrol grupları arasında eksprese edilen Cx43 yüzde oranı	28
<b>4.4.</b>	Deney ve kontrol grupları arasında eksprese edilen Cx43 şiddeti	29
<b>4.5.</b>	x40 objektifle çekilen mikrografta kontrol gruplarında granüloza hücreleri	30
<b>4.6.</b>	x40 objektifle çekilen mikrografta FSH uygulanan gruplarda granüloza hücreleri	32
<b>4.7.</b>	x40 objektifle çekilen mikrografta AMHR2 Ab uygulanan gruplarda granüloza hücreleri	34
<b>4.8.</b>	x40 objektifle çekilen mikrografta FSH ve AMHR2 Ab uygulanan gruplarda granüloza hücreleri	36

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	Deney grupları	21
<b>4.1.</b>	Deney ve kontrol gruplarında Cx43 oranı ve boyama şiddeti	27
<b>4.2.</b>	Farklı gruplarda eksprese edilen Cx43 yüzde oranı	28
<b>4.3.</b>	Kontrol grubu Cx43 boyanma şiddeti	31
<b>4.4.</b>	FSH verilen grup için Cx43 boyanma şiddeti	33
<b>4.5.</b>	AMHR2 Ab verilen grup için Cx43 boyanma şiddeti	35
<b>4.6.</b>	FSH ve AMHR2 Ab verilen grup için Cx43 boyanma şiddeti	37

## 1.GİRİŞ

Poli-Kistik Over Sendrom'u (PKOS) genç kadınlarda kronik anovulasyon ve hiperandrojenizmin en yaygın nedenidir, ve kadın popülasyonunun %5-10'unu etkiler. PKOS'da farklı büyüme aşamalarında duraksamış ultrasonografik görünümde artmış sayıda folliküller izlenir. Özellikle pre-antral ve antral folliküllerde Anti Mülleriyan Hormon (AMH) sentezinde artış belirgindir. Bu nedenle PKOS hastalarında, genellikle AMH seviyesi yüksek bulunur ve yüksek miktardaki AMH'nın, granüloza hücreleri üzerindeki follikül stimüle edici hormon (FSH) ile indüklenen aromataz aktivitesini inhibe ederek follikül gelişimini durdurduğu bilinmektedir (1,2). AMH, granüloza hücreleri üzerinde bulunan AMH Reseptör-II (AMHR2) üzerinden etkisini gerçekleştirir ve aromataz aktivitesini inhibe ederek estradiol (E2) üretimini durdurur. FSH aromataz aktiviteyi arttırmada ve cAMP oluşumunda pozitif etkiye sahiptir. FSH, granüloza hücrelerinde Cx43 ekspresyonunun'da artışını sağlar (3). Cx43 insan kumulus granüloza hücreleri arasında bulunan oluklu bağlantıların ana molekülüdür, hücreler arasında iletişimde rol alır. İnsanda oosit-kumulus kompleksinde granüloza hücrelerinde oluklu bağlantıların, oosit kompetansı ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir (3,4).

PKOS hasta grubu in-vitro fertilizasyon (IVF) tedavilerinde kontrollü ovaryen hiperstimülasyon sırasında Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) açısından riskli hasta grubu olarak kabul edilir. Bu tedavi sırasında uygulanan rekombinant follikül stimüle edici hormon (rFSH)'nin dozu önemlidir ve uygulanan doz yüksek olduğunda ciddi yan etkiler yaratabilir. OHSS, IVF tedavileri sırasında gelişebilen, ölümcül sonuçlar doğurabilecek bir komplikasyondur. PKOS da farklı büyüme aşamalarında duraksamış, özellikle pre-antral ve antral folliküllerde (primer olarak AMH sentezleyen) artış belirgindir. Bu nedenle PKOS hastalarında, genellikle AMH seviyesi yüksek bulunur ve yüksek miktardaki bu AMH'nın, granüloza hücreleri üzerindeki FSH ile indüklenen aromataz aktivitesini inhibe ederek follikül gelişimini durdurduğu bilinmektedir. AMH, granüloza hücreleri üzerinde bulunan AMHR2 üzerinden etkisini gerçekleştirmektedir ve aromataz aktivitesini inhibe ederek E2 üretimini durdurur. FSH aromataz aktiviteyi arttırmada ve cAMP oluşumunda pozitif



etkiye sahiptir. Rekombinant FSH'nın, PKOS hastalarında in vitro olarak granüloza hücrelerine uygulandığında insulin reseptörünün artmasına neden olduğu, aromataz (CYP19) aktivitesini etkilediğini gösterilmiştir (1,2).

PKOS hastalarında FSH etkisini Cx43 üzerinde gösteren çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca PKOS hastalarında AMH reseptör blokajı yapılarak, AMH etkisini granüloza hücreleri üzerinde azaltıp, CX43 artışını gösteren çalışma da bulunmamaktadır. Bu iki noktayı çalışmamızın özgünlüğü olarak değerlendirmekteyiz.

Çalışmada amaç infertilite nedeni ile başvuran PKOS hastalarından OPU (ovum pick up) sırasında elde edilen follikül sıvılarından oosit-kumulus kompleksi seçildikten sonra arda kalan follikül sıvılarından elde edilen granüloza hücrelerine rekombinant FSH (rFSH)'yı AMHR2 antikorunun (AMHR2 Ab) varlığında ve yokluğunda, uygulamak ve rFSH etkisini Cx43 üzerinde incelemektir. Bu çalışmada Cx43 aktivitesinin arttığını gösterebildiğimiz takdirde; IVF tedavisi sırasında elde edilen oosit-kumulus komplekslerinin kültür süreçlerinde kültür sıvılarına FSH eklenmesiyle oosit maturasyonu, kalitesi ve embriyo kalitesi üzerine olumlu etkisi olabileceği hipotezi üzerinden devam eden çalışmalar planlamayı düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Poli-Kistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS), hiperandrojenizm, ovulatuvar disfonksiyon ve polikistik over morfolojisi ile karakterize yaygın bir hastalıktır (5). Klinik tablo heterojendir ve karakteristik özelliklerin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak birkaç fenotip kategorisine ayrılabilir. Başta insülin direnci olmak üzere metabolik anomaliler, özellikle de hiperandrojenizm gösteren kadınlar arasında, etkilenen bireylerin çoğunda belirgindir (6,7). PKOS'lu kadınlar, metabolik anormallikler, tip 2 diyabet, infertilite, obstetrik komplikasyonlar, endometriyal kanser ve duygudurum bozuklukları için artmış risk taşırlar (5).

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

PKOS prevalansı dünya çapında oldukça benzerdir. Birleşik Devletler, Avrupa, Asya ve Avustralya'dan üreme çağındaki kadınlarda klinik olarak belirgin olan PKOS prevalansı, orijinal 1990 ABD Ulusal Sağlık Enstitüsünün (NIH) teşhis kriterlerine göre %5 ila %9 arasında değişmektedir (5). PKOS'lu birçok kadın, bazal ve glukozla uyarılan hiperinsülinemi gösterir ve vücut kütle indeksinden bağımsız olarak insüline dirençlidir (8). Obezitenin PKOS ve PKOS'un obezite üzerine etkisi karmaşıktır ve şu anda birbirleri arasında ilişki olduğuna dair güçlü kanıt bulunmamaktadır. PKOS, obez ve normal kilolu kadınlarda ortaya çıkmasına rağmen, yakın zamanda yapılan sistematik derleme ve meta-analizde, PKOS'lu kadınlarda obezitenin daha yaygın olduğu sonucuna varılmıştır (9). PKOS fenotipi veya obezite varlığına bakılmaksızın, PKOS'lu kadınlarda depresyon ve kaygı daha yaygın ve daha şiddetlidir (10,11). İlginç bir şekilde, depresyon skorlarının insülin direnci derecesi ile anlamlı korelasyona sahip olduğu görülmektedir (12). PKOS'lu 2,384 hasta ve 2,705 kontrol içeren 28 çalışmanın meta-analizi, PKOS'lu kadınlarda kontrollerden daha şiddetli duygudurum bozukluğu bulunduğunu tespit etmiştir. (10).

#### 2.1.2. PKOS Mekanizmaları ve Patofizyolojisi

PKOS'un altında yatan patofizyoloji ve iç mekanizmalar karmaşıktır, çünkü farklı etiolojiler bulunmaktadır. Farklı mekanizmalar arasındaki etkileşim,

duygudurum bozukluğu, psikoseksüel işlev bozukluğu ve uzun vadeli morbiditelere ek olarak, hiperandrojenizm, polikistik over morfolojisi (PCOM) ve ovulatuvar işlev bozukluğu da dahil olmak üzere, PKOS'un klinik özelliklerini ortaya çıkarır. Buna ek olarak, PKOS'un gelişimi güçlü bir genetik bileşene de sahiptir (5). Ailesel ve ikiz çalışmalarından elde edilen sonuçlar, PKOS için altta yatan genetik temeli kuvvetle desteklemektedir (13).

Normal koşullar altında, olgunlaşmamış oositler birkaç hormonun, özellikle de FSH'nin etkisi altında olgunlaşır ve lüteinize edici hormon (LH) etkisiyle ovulasyonun gerçekleşir. PKOS'taki nöroendokrin anormallik, artmış GnRH etkisiyle FSH ve LH üretimini artırır. Bu anormallik dolaşımdaki LH/FSH oranının artmasına neden olur. Bu artış PKOS'lu kadınlarda sıklıkla görülür (14). Artan LH/FSH oranı ve overde FSH'ye direnç, over follikülleri içindeki teka hücrelerindeki androjenlerin hipersekresyonunu artırarak folliküler gelişimini engeller. Buna bağlı olarak progesteron ile GnRH inhibisyonunu azaltır ve böylece PKOS'un gelişimini de teşvik eder (15).

PKOS'da bozulmuş, düzensiz ovulasyon veya anovülasyon; LH, FSH, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1), AMH, androjen dönüşümünde rol oynayan enzimler ve olası diğer faktörlerin etkileşimi birliktedir. PKOS'da, dominant follikül seçimi düzenli olarak gerçekleşmez, bu durum FSH salınımının yetersizliği ve/veya FSH inhibisyonunun bir sonucudur (16). PKOS'daki artmış AMH seviyesi folliküler FSH direncine yol açan faktörlerdendir. Bu folliküllerinin FSH hassasiyetini düşürebilir ve aromataz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla androjenlerin östrojenlere dönüşmesini engeller, böylece hiperandrojenizme katkıda bulunur (17). FSH molekülünün kendisinde ve reseptöründeki genetik varyasyonlar, PKOS'lu hastalar ile sağlıklı kontroller arasındaki FSH duyarlılığındaki bazı farklılıklardan kısmen sorumlu olabilmektedir (18). Dolaşımdaki artan AMH seviyeleri, küçük antral (olgunlaşan) follikül sayısının artmasına yol açar. Olgunlaşmış küçük antral folliküllerin granüloza hücrelerinde AMH'nin aşırı sekresyonu, FSH ve aromatazin inhibisyonuna ve dolayısıyla folliküler büyümenin bozulmasına neden olur (19).

LH hipersekresyonu normal follikül büyümesi için de zararlıdır ve granüloza hücrelerinin prematür lüteinizasyonuna neden olabilir (16). LH'nin aşırı uyarılması, teka hücre kaynaklı androjenlerinin aşırı salınımını indükler, bu da primordiyal follikül büyümesinin başlatılmasını ve büyüyen küçük antral folliküllerin sayısını arttırarak folliküler olgunlaşmayı daha da bozmaktadır (20). Teka hücrelerinin LH tarafından aşırı uyarımı, doğrudan insülin reseptörü vasıtasıyla veya dolaylı olarak IGF1 reseptörü aracılığıyla etki eden insülinin teka hücreleri üzerindeki gonadotropik etkisi ile artmaktadır (21).

PKOS'da gözlenen artmış over androjen üretimi, çoğunlukla, steroidojenik enzimleri kodlayan birkaç genin ekspresyonunun artmasıyla, folliküler teka hücreleri tarafından gerçekleşir (22). McAllister ve ark. (22) PKOS için aday bir gen olan DENND1A'nın, PKOS'lu hastalardan elde edilen teka hücrelerinde aşırı eksprese edildiğini ve en azından bazı hastalarda overlerde üretilen androjen fazlasının genetik olarak PKOS'un belirlediği bir özellik olduğunu desteklediğini bildirmiştir. Ayrıca, androjen biyosentezinde CYP17A1 hız kısıtlayıcı enzimi kodlayan genin ekspresyonu, PKOS'lu kadınlardan elde edilen teka hücrelerinde artar. Bu da progesteron öncüllerinin androjenlere daha yüksek oranda dönüşümüne katkıda bulunabilir (22). PKOS'lu kadınlardan izole edilen teka hücreleri, sağlıklı kontrollerin teka hücrelerinden, insülin ve LH' ya androjen salınımı açısından daha duyarlıdır (21). Hiperinsülinemi, doğrudan overlerde androjen salınımını stimüle etmenin yanı sıra, artmış serbest testosteron fraksiyonlarına yol açarak Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG)'nin hepatik sentezini azaltarak PKOS'daki hiperandrojenizme katkıda bulunur (23).

PKOS hastalarında, genellikle AMH seviyesi yüksek bulunur ve yüksek miktardaki bu AMH'nın, granüloza hücreleri üzerindeki FSH ile indüklenen aromataz aktivitesini inhibe ederek follikül gelişimini durdurduğu bilinmektedir (1,2). Serum AMH düzeyindeki bu artışın nedeni sayı artışından farklı üç şekilde açıklanabilir:

i) granüloza hücrelerinin intrinsik disregülasyonu, ii) AMHR2 reseptörünün artmış ekspresyonu, iii) polikistik overdeki antral follikülde artmış AMH üretiminde

androjenlerin rolü. Serum androjen seviyesi ile AMH seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir, androjenlerin aşırı üretimi PKOS da teka hücrelerinin intrinsik defekti nedeniyle olabilmektedir. Gonadotropinlerin AMH regülasyonu üzerindeki etkisi ile ilgili çelişkili çalışmalar bildirilmiştir. Bazı gruplarca gonadotropinlerin (özellikle FSH'nın) in vivo normal ovaryumlarda AMH üretimini inhibe ettiği bildirilirken; farklı gruplar ise PKOS lu kadınlarda FSH stimülasyonu ile granüloza hücrelerinin AMH üretimi azaldığını ancak normal kadınlarda böyle bir etkinin olmadığını belirtmiştir. Bunun tam zıttı olacak şekilde FSH'nın hem normal over hem de PKOS'lu overde AMH ekspresyonu üzerine stimüle edici etkisinin bulunduğu bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu farklı sonuçlar ancak yakın zamandaki bir çalışmada E2 nin AMH ekspresyonunu inhibe edici etkisinin gösterilmesi ile açıklanabilir: bu çalışmaya göre FSH küçük antral follikülleri aromatoz eksprese etmedikleri sürece direk olarak stimüle edebilir. Ancak daha büyük folliküllerde dominant follikül seçilerek artan E2 üretimi aracılığıyla, FSH indirek olarak (östrojen negatif-etkisi aracılığıyla) AMH ekspresyonunu inhibe edebilir (24). AMH, granüloza hücreleri üzerinde bulunan AMHR2 üzerinden etkisini gerçekleştirmektedir ve aromataz aktivitesini inhibe ederek E2 üretimini durdurur. FSH aromataz aktiviteyi arttırmada ve cAMP oluşumunda pozitif etkiye sahiptir. Rekombinant FSH'nın, PKOS hastalarında in vitro olarak granüloza hücrelerine uygulandığında insulin reseptörünün artmasına neden olduğu (25), aromataz (CYP19) aktivitesini etkilediğini gösterilmiştir (26).

FSH, granüloza hücrelerinde Cx43 ekspresyonunun da artışı sağlar bu da oosit büyümesine ve granüloza hücrelerinin farklanmasına neden olur. Cx43 insan cumulus- granüloza hücreleri arasında bulunan oluklu bağlantıların ana molekülüdür ve hücreler arası membran kanallarını oluşturarak hücreler arasında iletişimde rol alır. Cx43'ün insan granüloza hücrelerinde eksprese olduğu ve bu oluklu bağlantıların; oosit kompetansı ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Bu molekülün plasental büyüme ile ilişkisi olduğu da bildirilmiştir (3,4,27,28).

## 2.2. Konneksinler

Konneksonlar, konneksin adı verilen integral membran proteinlerinden oluşan, hücrelerarası iletişimi sağlayan simetrik bağlantılardır. Altı adet konneksin monomeri bir konneksin yarım kanalını oluşturur. Konneksin plazma membranında bulunan içi boş silindirik yapıdır ve iki komşu hücrenin sitoplazması arasında doğrudan bir iletişim kanalı sağlar. Konneksinlerin çapı 1,5 - 2 nm civarındadır. Konneksinler homolog protein ailesinden olup, farelerde 20, insanlarda 21 tip konneksin bulunmaktadır ve bunların her biri ayrı bir genin ürünüdür (29). Konneksinler boyut açısından büyük farklılıklar gösterir ve bu farklılık bunları ayırt etmek için kullanılır. Örneğin, Konneksin 23 (Cx23), 23 kD ağırlığında memeli konneksinlerden en küçük olanıdır ve Konneksin 62 (Cx62), 62 kD ağırlığında en büyük konneksindir (30). Bunlar hücreler arası oluklu bağlantılar oluşturarak, hücreler arasında inorganik iyonların ve küçük moleküllerin doğrudan paylaşılmasını sağlarlar.

Tüm konneksinler zara yayılmış, kanal oluşturan dört kısma sahiptir. Kenetlenme alanları olarak işlev gören iki hücre dışı parçası, bir sitoplazmik halka ve kanal işlevinin düzenlenmesinde yer alan sitoplazmik N- ve C-terminal kuyruk parçaları bulunmaktadır (29,31). Konneksinler arasındaki sekans benzerliği, transmembran alanlarında ve hücre dışı döngülerde yoğunlaşırken, dizi ve uzunluk varyasyonlarının çoğu sitoplazmik halka ve C-terminal kuyruklarında bulunur (27).

Her bir konneksin farklı hücre tipleri arasında karakteristik bir dağılıma sahip olmakla birlikte, dağılımları çakışmaktadır çünkü birçok hücrede konneksin ailesinin birden fazla üyesi eksprese olmaktadır(32). Farklı Konneksinler, iyonik iletkenlik, çözünen geçirgenlik, pH, hücrelerarası voltaj ve fosforilasyon gibi düzenleyici faktörlere duyarlılık, hücre içi metabolik bağlantının seçiciliğini ve regülasyonunun mükemmel kontrolünü sağlayan çok farklı özellikler sergileyebilir (33). Ayrıca, konneksin çeşitliliği, farklı konneksinlerden oluşan kanalların farklı gelişimsel veya fizyolojik rolleri olduğu anlamına gelir (34).

Bazı Konneksinler oluklu bağlantı kanalları oluşturabilme yeteneklerinden bağımsız olarak önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin, birkaç konneksin (en önemlisi CX43) plazma zarında, sitoplazma ve ekstrasellular matriks arasında belirli metabolitlerin ve küçük sinyal moleküllerinin değişimi için bir kanal sağlayabilirler (35). İç mitokondriyal membran, demonte edilmemiş Cx43 konneksonları için bildirilen diğer bir konumdur ve zar boyunca K<sup>+</sup> akışını kolaylaştırmaktan sorumludur (36). Cx43, hücre proliferasyonunun regülatörüdür ve bu işlevi kanalları oluşturma kabiliyetinden bağımsızdır (37). Cx43'ün C-terminalı hücre büyümesini baskılamada tam uzunlukta protein kadar etkili olabilir (38). Cx43'ün ayrıca hücre iskeletini stabilize edebilme yeteneği vardır (39).

### **2.2.1. Oogenez İle İlişkili Konneksinler**

Cx37 ve Cx43 hem büyüyen hem de olgun follüküllerin oluklu bağlantılarında, ancak farklı yerlerde tespit edilmiştir. Fare geni knock-out, hem Cx37 hem de Cx43'ün follükül gelişiminin erken döneminde önemli olduğunu açıkça ortaya koymuştur (40). Fare overlerinde, Cx37 oosit yüzeyindeki oluklu bağlantılar için lokalize olur ve böylece oosit-granüloza hücresi metabolik bağlamasından sorumlu olurken, Cx43 granüloza hücrelerini birbirine bağlar (41). Hem oosit hem de granüloza hücreleri Cx37'yi eksprese eder, ancak granüloza hücrelerinde Cx37 trans-zonal uzantılarında bulunur. Cx43 granüloza hücrelerini birbirleriyle birleştiren oluklu bağlantılar oluşturmaya yarar(42).

Cx37 ve Cx43 de insan follüküllerinde eksprese edilir (43,44). Kültürdeki kumulus hücrelerin incelenmesi sonucu, Wang ve ark. (43) Cx43'ün belirgin oluklu bağlantılar oluşturduğunu ancak Cx37'nin bu hücrelerde gösterilemediğini bildirmiş ve Cx37'nin farede olduğu gibi insan follüküllerinde de kumulus-oosit arayüzünde bulunduğunu ifade etmişlerdir. Cx43'ün insan kumulus hücrelerindeki oluklu bağlantılarda önemi, Cx43 ekspresyon seviyesinin, elektrofizyolojik olarak ölçülen hücre içi miktarı ile pozitif korelasyon gösterilmiştir (43).

### 2.2.2. Konneksin 43

Cx43, dokularda en fazla bulunan oluklu bağlantı proteini'dir. Cx43, insan dokularında eksprese edilir ve birden fazla mekanizma ile hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. Cx43, oluklu bağlantıdaki hücresel iletişimin yanısıra yarım kanal ve protein-protein etkileşimi gibi bağımsız fonksiyonları da yürütür. (45,46).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Cx43 bir çok dokuda tespit edilmiştir. Tesbit edilen bu doku ve hücreler içinde kardiyomyositler, düz kas hücreleri, ağız boşluğu keratinositleri, odontoblastlar, diş pulpa hücreleri, periodontal fibroblastlar, tükürük bezlerinde bulunan miyoepitelyal hücreler, özefagus epitel hücreleri, mide epitel hücreleri, gastroduodenal kas hücreleri, ince bağırsak kas hücreleri, ince bağırsakta bulunan "Cajal" hücreleri, kolon kas hücreleri, pankreas  $\beta$  endokrin hücreleri, ön ve arka hipofizdeki hücreler, paratiroid bezi, tiroid bezi epitel hücreleri, adrenal bez, deri keratinositleri, dermal fibroblastlar, miyoblastlar, beyin astrositleri, leptomeningiyal hücreler, ependim hücreleri, testis sertoli hücreleri, leydig hücreleri, over granüloza hücreleri, uterus miyometrial hücreler, tuba uterina epitel hücreleri, düz kas hücreleri, meme bezi epitel hücreler, akciğer alveoler epitel hücreleri, trakea düz kas hücreleri, kemik osteoblastları, osteoklastlar, osteositler, kıkırdak kondrositleri, böbrek vasküler ve glomerül hücreleri, mesane düz kas hücreleri, retinal gliyal hücreler, timus timik epitel hücreleri, kemik iliği stromal hücreleri, lenf nodülü ve dalakta bulunan folliküler dendritik hücreler ve tonsiller epitel hücreleri bulunmaktadır (47).

### 2.3. Granüloza Hücreleri

Ovaryumun steroidojenik hücreleri, bazal tabakayla ayrılan, oositi kuşatan avasküler granüloza hücreleri ve over stromasında bulunan teka hücrelerinden oluşmaktadır (48). Ovaryum, pregnenolon, progesteron,  $17\beta$ -hidroksiprogesteron,  $17\beta$ -hidroksipregnenolon, dehidroepiandrosteron, androstenedion, testosteron, estron ve  $17\beta$ -estradiol de dahil olmak üzere birtakım steroidleri salgılar (49).



## **2.4. Pre-Antral Follikül Gelişiminde Androjenler-FSH-AMH Etkileşimleri ('Gonadotropin Bağımsız' Follikül Büyümesi)**

### **2.4.1. Androjenlerin Rolü**

Önceki çalışmalarda androjenlerin artışının follikül atrezisini de arttırdığı gösterilmiştir (49). Fare modeli ile yapılan bir çalışmada, androjenlerin granüloza hücrelerinin apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir (50). Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar, androjenlerin follikül gelişimine uyarıcı rolü olduğunu göstermiştir. Örneğin, Vendola ve ark. (51), testosteron ve dihidrotestosteron (DHT) ile tedavi edilen yetişkin dişi Rhesus maymunlarında büyüyen follikül sayısının yanı sıra, granüloza ve teka hücrelerinin çoğalmasını bildirmiştir. Öte yandan, androjen reseptörü (AR) eksikliği olan fareler pre-ovuluar folliküllerinde daha fazla apoptotik granüloza hücrelerine sahiptir ve sonuç olarak bu fareler düşük bir ovulasyona göstermektedir (52,53).

AR en fazla fare folliküllerinde eksprese edildiğinden ana androjen etkisinin follikülogenezin erken aşamalarında gerçekleştiği düşünülmüştür (54). Hillier ve ark. (55), primatlarda AR'nin preantral ve erken antral folliküllerde en fazla miktarda bulunduğunu ve pre-ovuluar folliküllerde neredeyse olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca, Catteau-Jonard ve ark. (56) büyük pre-ovuluar folliküllerdeki insan granüloza hücrelerinin AR geninin küçük olanlara kıyasla, daha düşük bir ekspresyonunu bildirmişlerdir. Bu sonuç, insan follikül olgunlaşması ile birlikte AR ekspresyonundaki düşüş ile tutarlıdır (57).

### **2.4.2. FSH'nin Rolü**

Gonadotropinlerin gonadotropin bağımsız follikül büyümesi üzerine etki etmesi beklenmemekle birlikte, aslında küçük antral follikülden daha erken bir evrede FSH'nin Granüloza hücreleri üzerindeki olası etkisine ilişkin soru ortaya çıkmaktadır (58). Bazı veriler, granüloza hücrelerinin pre-antral follikül evresinde (59) FSH reseptörünü (FSHR) ekspresyon ettiğini göstermektedir. Otoradyografi ile, insan overlerinin histolojik kesitleri üzerinde, Yamoto ve ark. (60) FSHR'nin preantral

folliküllerin granüloza hücrelerinin yüzeyinde ve folliküler büyümenin değişik evrelerinde antral folliküllerde var olduğunu ortaya koymuşlardır.

Follikülogenez sırasında FSHR'nin erken ekspresyonuna rağmen, FSH'nin başlangıçtaki folliküler büyüme üzerindeki etkisi tartışmalıdır.  $\beta$ -FSH veya FSHR geni eksik olan knock-out farelerde, folliküller preantral evreye kadar geliştirmektedir (61). Bu genlerden birinde mutasyona sahip olan kadınlarda folliküller pre-antral follikül aşamasına kadar büyür (62). Bu veriler ilk folliküler büyümenin FSH'dan bağımsız olacağı anlamına gelmektedir (63). Öte yandan, diğer gruplar, hayvan deneylerinde FSH'nin follikül büyümesinin başlatılması için gerekli olmamasına karşın, bu süreci destekleyeceğini göstermiştir. Örneğin, neonatal overlerin hipofizektomize (düşük FSH) veya kastrasyonlu (yüksek FSH) sıçanlara nakli, FSH'nin preantral folliküllerin gelişimini desteklediğini ortaya koymuştur (64). Hipofizektomize sıçanlarda ve farelerde, preantral follikül evresine kadar farklı follikül çeşitleri saptanmıştır (65). Bununla birlikte, morfolojik olarak normal preantral follikül sayısı kontrollerle karşılaştırıldığında daha az görülmektedir. Benzer gözlemler, hipogonadotropik hipogonadizmin fare modellerinde (66) ve bir GnRH antagonisti ile tedavi edilen küçük sıçanlarda (67) yapılmıştır. Bağışıklık yetersizliği ve hipogonadotropik farelerin böbrek kapsülü altında nakledilen insan overlerinin ksenograftları, iki tabakalı granüloza hücreleri olan follikül aşamasından itibaren FSH'nin erken follikül büyümesi için gerekli olacağını düşündürmektedir (68).

Koyunlarda, over korteks dokusu otograft modeli kullanarak yapılan deneyler, endojen FSH'nin, preantral follikül büyümesinin açık bir uyarımı ile sonuçlandığını ortaya koymuştur (69). Dolayısıyla, FSH'nin androjen, kit-ligand, leukemia inhibe edici faktör (LIF) ve büyüme ve farklılaşma faktörü-9 (GDF9) gibi diğer uyarıcı faktörlerle sinerjik olarak bazal follikül büyüme evresi boyunca follikül büyümesini orta düzeyde uyarması mümkündür (58). FSH yokluğunda, bu uyarıcı faktörler 'FSH'dan bağımsız' bazal follikül büyümesini devam ettirecek, ancak bu daha az etkili olacaktır (70).

### 2.4.3. AMH'nin Rolü

AMH, birincil follikül evresinin hemen başında granüloza hücreleri tarafından salgılanan, Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) ailesine ait bir glikoproteindir (71). Salgılaması, seçilebilir follikül aşamasında maksimum düzeydedir. Daha sonra folliküllerin FSH'ya bağlı seçim süreci başladığında AMH'nin granüloza hücreleri tarafından salgılanması azalmaktadır (71).

AMH'nin follikülogenez üzerinde iki etkileyici penceresi olduğu düşünülmektedir. Birincisi, primordial follikülden primer folliküle geçişi inhibe edici bir etki yaratarak farelerde ve insanlarda ilk follikül seçimini negatif bir şekilde düzenler (72). İkincisi, FSH bağımlı döngüsel süreci engeller. AMH'nin gonadotropin bağımsız follikül büyümesi boyunca bir rol oynaması düşünülmektedir (70).

AMH geni için fare knock-out modeli in vitro verilerine baktığımızda, AMH'nin bu sürekli fonksiyonu desteklenmektedir (73,74). Durlinger ve ark. (73), tarafından yapılan in vivo çalışmada, AMH geni knock-out (AMH -/-) farelerinde, kontrol farelerine kıyasla, preantral follikül aşamasının ötesinde olanlar da dahil olmak üzere, tüm aşamalarda büyüyen follikül sayısında belirgin bir artış gösterilmiştir. Bu grubun ikinci çalışmasında, AMH -/- farelerden alınan follikülleri içeren hücre kültürü ortamına AMH eklenmesi, FSH varlığında dahi folliküler gelişimini yavaşlattığı ve AMH'nin FSH'ye bağlı granüloza hücrelerinin proliferasyonundaki inhibisyon etkisini düşürmüştür (74).

### 2.4.4. AMH, FSH ve Androjenler Arasındaki Etkileşimler

Androjen'ler, FSH reseptörü ekspresyonunu arttırarak, granüloza hücreleri üzerindeki FSH etkilerini uyarır (70). Shiina ve ark. (75) AR için knock-out farelerde (AR - / -), FSHR'yi kodlayan mRNA düzeylerinin düştüğünü ve androjenlerin FSHR ekspresyonunu olumlu etkilediğini göstermişlerdir. Bu hipotez in vitro sıgır granüloza hücreleri modelinde doğrulanmıştır. Luo ve Wiltbank (76) AR'ni içeren testosteron ve DHT'nin etkisi altında FSHR geninin transkripsiyonunun arttığını göstermişlerdir. İnsanlarda FSHR'nin ekspresyonu, androjenler tarafından artmış AR ekspresyonu ile artmaktadır (77). Kontrol grubuna kıyasla PKOS'lu kadınlardan

alınan granüloza hücrelerinde gözlemlenen AR ve FSHR'nin paralel artmış ekspresyonu, bu fizyolojik etkinin PKOS'da çoğaldığını düşündürmektedir (56). Sen ve ark. (78) androjenlerin, transkripsiyondan bağımsız ekstra-nükleer bir mekanizma ile FSHR'yi arttırdığını göstermişler ve genomik olmayan mekanizmaları önermişlerdir.

AMH, granüloza hücrelerinde FSH'nin büyümeyi destekleyici etkilerine karşı müdahale eder. Follikülojenez için kesin bir zamanlamanın gerekmesi ve özellikle prematüre granüloza hücrelerinin farklılaşmasını önlemek için, FSH gibi hızlandırıcı bir faktörün bir baskılayıcısının olması gerekmektedir. Pre-antral ve küçük antral folliküllerin granüloza hücreleri tarafından öncelikle salgılanan AMH bu baskılayıcı faktörlerden biri olabilir (70). Nitekim AMH - / - farelerine uygulanan FSH tedavisi, normal farelere kıyasla erken folliküler büyüme oranını arttırmıştır (79). Bu veriler, AMH yokluğunda, büyüyen folliküllerin FSH'ye daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, AMH preantral folliküllerin FSH'ye duyarlılığını inhibe edebilir ve böylelikle follikül büyümesini olumsuz şekilde düzenleyebilir (70). Bu deneysel veriler, ilk önce follikül büyümesinin AMH - / - normal farelerden daha fazla olduğu prepubertal farelerde doğrulanmıştır (79). Bu bulgular primordiyal follikül havuzunun kontrolsüz tükenmesine ve FSH'nin erken seçimine karşı, fizyolojik bir zorunluluk olarak görülebilecek AMH'nin, dengeleyici bir etkisini savunmaktadır (77). Bunun tersine, PKOS gibi aşırı AMH üretimine sahip patolojik durumlarda, bu koruyucu etki abartılı olabilir ve bu da daha yavaş follikül büyümesine ve dolayısıyla follikül birikimine neden olabilmektedir (80).

Androjenlerin, AMH üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Aslında androjenler doğrudan bir etkiye sahip değildir ve granüloza hücrelerinde FSH'ye duyarlılığının yükseltilmesi yoluyla, dolaylı olarak AMH ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alabilirler (70). Bununla birlikte, teka hücre kaynaklı androjenlerden bağımsız, teka hücrelerinden gelen diğer ürünler, granüloza hücreleri tarafından ekspresyon edilen AMH ekspresyonunu kontrol edebilir (70). Örneğin, insan (81) ve koyun (82) teka hücreleri tarafından sentezlenen kemik morfogenezik proteinlerinin (BMP'ler),

granüloza hücrelerinde AMH üretimi üzerindeki uyarıcı etkisi in vitro olarak gösterilmiştir.

FSH pre-antral folliküllerde AMH ekspresyonunu uyarır. Her ne kadar FSH'nin AMH ekspresyonunu indüklediğini bilmekle birlikte, bu kavram pek çok çelişkili sonuç ile tartışmalı kalmaktadır (70). Örneğin, Kuroda ve ark. (83) FSH ile tedavi edilen erkek sıçanlarda testislerdeki AMH düzeylerinin büyük oranda azaldığını göstermiştir. Bu nedenle bu ilk çalışma, FSH'nin AMH ekspresyonu üzerinde inhibe edici etkisi olduğu anlamına gelmiştir. Dişi sıçanda, Baarends ve ark. (84) FSH'yı günde 10 IU dozunda 4 gün süreyle, GnRH antagonistleriyle kombine olarak uygulamışlar ve folliküller içerisinde AMH ekspresyonunda bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Kadınlarda yapılan bazı çalışmalarda, IVF için eksojen FSH ve GnRH agonistleri veya antagonistleri kullanan ovaryen stimülasyon tedavileri sırasında serum AMH düzeyleri %50'den fazla düşmektedir (85). Benzer şekilde, düşük doz FSH uyarımı sırasında serum AMH, kontrol (86) veya PKOS'lu (87) kadınlarda azalmaktadır.

Nitekim, diğer in vivo çalışmalar, FSH'nin AMH üzerindeki uyarıcı bir etkisinin olduğu lehindedir. FSH geni (88) için yetersiz olan knock-out farelerinde, erkek prepubertal farelerde (89) FSH tedavisi, testiste AMH ekspresyonunu ve serumda seviyesini yükseltir. Thomas ve ark. (90) Dişi primatta serum FSH ve LH düzeylerinde azalma ile sonuçlanan GnRH antagonistlerinin in vivo olarak uygulanmasında, pre-antral ve küçük antral folliküllerde AMH salınımının azalmasını göstermişler. Kadınlarda, diğer çalışmalar FSH'nin AMH ekspresyonu üzerine olumlu bir etkisini desteklemektedir. Özellikle, birkaç grup, GnRH agonistleri (91,92) veya östrojen progestin hapları ile gonadotropin ekseninin inhibisyonuna sekonder olarak serum AMH düzeylerinde bir düşüş göstermiştir (93,94). Benzer şekilde, gebelik sırasında da serum AMH'sında bir düşüş gösterilmiştir (95). Son olarak, hipogonadotropik hipogonadizm hastalarında, serum AMH düzeyi, muhtemelen FSH'ye bağımlı büyümekte olan folliküllerin bulunmaması nedeniyle düşüktür. Gonadotropinler ile uyarı tedavisine başlandığında AMH düzeyi yükselmektedir (96).

## **2.5. Antral Follikül Gelişiminde FSH-AMH-Östradiol Etkileşimleri ('Gonadotropin Bağımlı' Follikül Büyümesi)**

Bu folliküler evrede androjenlerin AMH'nin etkileri gibi granüloza hücreleri üzerinde etkisi azalırken, FSH, E2 sentezleme kapasitesi gibi granüloza hücrelerinin farklılaşma işlevlerini pozitif yönde etkiler. Bu nedenle androjenlerin rolü ve bunların FSH ve AMH ile etkileşimi artık geçerli değildir ve E2 graff follikül olgunlaşmasına kadar giderek daha fazla önem kazanmaktadır (70).

### **2.5.1. Aromataz Ekspresyonu**

E2, androjenleri (teka hücrelerinden gelen) östrojenlere dönüştüren enzim aromatazın etkisi ile granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. Aromataz, pre-antral folliküllerde fetal granüloza hücreleri tarafından zaten ekspresyon edilir (26) ancak doğumuna kadar ekspresyonu nispeten düşük kalır. Hemen doğum çağındaki preantral ve küçük antral folliküllerde kademeli miktarda artar. Daha sonra primer ve pre-antral folliküllerde aromataz ekspresyonu azalır ve sadece çocukluk çağında büyük antral folliküllerde bulunur (26). Doğum sonrası dönemdeki bu ekspresyonun artması gonadotropinlere ve özellikle de FSH'ya bağlıdır (97). Bununla birlikte, artan aromataz ekspresyonu, bu noktada optimum steroidojenik sürecin uygulanmamasından ötürü plazma E2 seviyelerinde belirgin bir artışa neden olmaz. Steroidogenezis puberteden sonraki dönemde belirgin ortaya çıkar. Bununla beraber, büyük antral ve preovulatuvar folliküllerde aromataz ekspresyonu artar (26).

### **2.5.2. FSH-Aromataz İlişkisi**

Aromataz geninin (CYP19) ekspresyonu FSH tarafından önemli ölçüde uyarılır. FSH'nin reseptörüne bağlanması artan siklik AMP'ye sekonder olan transkripsiyon faktörü cAMP response element binding protein (CREB)'nin fosforilasyonunu ve dolayısıyla protein kinaz A'nın aktivasyonunu indükler. Fosforile faktör CREB, CYP19 geninin up-regülasyonunda cis-aktive eden sekanslar CRE'ye (cAMP response element) bağlanır ve böylece bu genin transkripsiyonunu uyarır (26,98).

### 2.5.3. AMH-FSH Kaynaklı Aromataz Aktivitesi İlişkisi

İnsanlarda, küçük antral folliküllerin follikül sıvısında AMH ve östradiol düzeyleri arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir ve bu da her bir follikül içinde AMH ekspresyonu ve FSH aktivitesi arasında yakın bir karşılıklı etkileşim olduğunu göstermektedir (99). Grossman ve ark. (100), IVF tedavisindeki normo-ovulatuvar hastaların follikül sıvısından elde edilen kültürdeki insan granüloza hücrelerinde aromatazın kalitatif aktivitesi üzerinde AMH'nin inhibitör etkisi olduğunu göstermiş; ve bunu da CYP19 gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı bir etki ile açıklamıştır.

Fertilite prezervasyonu için alınan insan overlerindeki küçük antral folliküllerin follikül sıvısında Nielsen ve ark. (101) AMH düzeyleri ile CYP19 geni ekspresyonu arasında anlamlı negatif korelasyon göstermiştir. Görünüşe göre AMH, adenilat siklazın katalitik aktivitesinin inhibisyonu yoluyla FSH etkisini bastırmaktadır (102). Granüloza hücrelerine kültür ortamında AMH uygulaması, siklik AMP üretiminde CYP19 geninin transkripsiyonunda azalmaya neden olur (102). Pellatt ve ark. (24) aynı zamanda insan granüloza hücre kültürlerinde AMH'nin FSH'ye bağlı aromatazın katalitik aktivitesini CYP19 geninin baskılanması yoluyla inhibe ettiğini doğrulamıştır. Daha yeni çalışmalar, bu verileri teyit etmektedir ve AMH'nin aromatazın bazal ekspresyonunu etkilemediğini, ancak FSH uyarıcı etkisini özellikle zayıflattığını önermektedir (104).

### 2.5.4. Östradiol-AMH İlişkisi

İn vivo çalışmalar, E2'nin AMH ekspresyonunu bastırdığını savunmaktadır. Bunun için birinci neden, pubertal geçiş sırasında, gonadotropin artışı ile E2 düzeylerinde yükselme ile ilişkilidir (105,106) ve bu da serum AMH'sindeki hafif düşüşü açıklayabilir. İkincisi, IVF için ovarian uyarım sırasında kadınlarda yapılan tüm çalışmalar, plazma AMH düzeylerinde belirgin bir düşüş olduğunu bildirmektedir ve hCG tetikleme gününde en düşük seviyede olduğunu göstermişler (85,107). Bu çalışmaların her biri hCG gününde serum AMH ve östradiol düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulmuştur. Örneğin Lee ve ark. (107), uyarılmanın

başlangıcından hCG gününe kadar sırasıyla serum E2 ve AMH'nin göreceli olarak artması ve azalması arasında negatif bir korelasyon göstermiştir. Olgun folliküllerin folliküler sıvıdaki E2 ve AMH konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi araştıran diğer çalışmalar da benzer sonuçlar vermiştir (101,108).

Bunun tersine, La Marca ve ark. (86), spontan siklusların folliküler fazında serum E2 ve AMH düzeyleri arasında böyle negatif bir ilişki gözlenmediğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Liberty ve ark. (109), E2'nin AMH üzerindeki baskıcı etkisinin fizyolojik olarak anlamlı olup olmadığını ve sadece iyatrojenik olup olmadığını sorguladılar ve spontan siklus, klomifen sitrat veya gonadotropinler tarafından indüklenen siklus, IVF için ovarian stimülasyon ve dondurulmuş embriyo transferi için yüksek doz oral veya transvajinal östrojen tedavinde serum AMH değişikliklerini karşılaştırmıştır. Ovarian stimülasyon grubu hariç, AMH düzeyleri diğer gruplarda değişiklik göstermemiştir. Bununla birlikte, daha yakın zamanlarda, spontan sikluslarda ovülasyondan 5 gün öncesinden 2 gün sonrasına kadar AMH'de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (110). Bu tutarsızlık, daha yakın tarihli çalışmada (110) kullanılan AMH testinin daha hassas olduğu ve ekzojen E2'nin sistemik etkisinin, FSH'nin etkisi altında granüloza hücreleri içinde yerel olarak üretilen E2'nin indüklediği etkiden daha az olacağı gerçeği ile açıklanabilir (70).

In vitro veriler AMH'nin E2 baskısı altında olduğunu göstermektedir. E2, AMH geninin promotöründe bir yanıt elementine sahiptir (111). Daha spesifik olarak, Grynberg ve ark. (112) E2'nin, östrojen reseptörü (ER)  $\alpha$  aracılığıyla AMH'yi uyarıcı bir etkiye sahip olurken ve ER  $\beta$  yoluyla AMH üzerinde bir önleyici etkisi olduğunu açıklamıştır. ER- $\beta$  büyüyen folliküllerdeki granüloza hücrelerinin başlıca reseptörüken, ER- $\alpha$  daha sonra korpus luteumda baskın hale gelmektedir (113). Dolayısıyla, geç follikül büyüme fazı esnasında estradiol'ün AMH üzerindeki etkisi esas olarak önleyici olacaktır ve bu nedenle FSH'nin, E2'nin hiç veya az miktarda eksprese eden daha pre-antral folliküllerin hakim olduğu AMH üzerindeki, uyarıcı etkilerini aşacaktır (70).



## 2.6. Androjen'den Östrojen Bağımlı Folliküllere Geçiş

Androjenler, AMH, FSH ve E2 arasındaki ilişkiler, döngü ve follikül gelişim aşamasına bağlı olarak değişir (70).

Pre-antral evreye kadar, E2 yokluğunda AMH ekspresyonu maksimumdur. Bu olay androjenlerin etkisi altındaki granüloza hücrelerinin FSH aktivitesinin arttırılması yoluyla, ve ayrıca teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan BMP'ler gibi büyüme faktörleri vasıtasıyla, gerçekleşir. Folliküler büyüme ilerledikçe androjen etkisi azalır ve E2 üretimi, folliküllerde AMH üretiminin bastırılmasının eşik değerine ulaşana kadar yavaş yavaş artar (70). Dolayısıyla E2, FSHR ekspresyonundaki artış ve LH reseptörlerinin (LHR) elde edilmesi de dahil olmak üzere follikül transformasyonunu kontrol altına alır, seçilebilir folliküllerin kohortunun bir parçası olmasını sağlar (70).

Tüm folliküller bu senaryoyu takip etmez ve AMH, androjenik süreçten östrojeniğe geçişi modüle eden faktörlerden biri olabilir, böylece sınırlı sayıda follikülün siklik seçilme sürecine geçmesine izin verilir. Baarends ve ark. (84), sıçan ovaryumlarında, atretik olmayan büyük preantral ve küçük antral folliküllerde AMH geninin farklı bir ekspresyonu olduğunu açıklamıştır. Bu folliküllerin morfolojik olarak ayırt edilemez olmasına rağmen, bazıları AMH genini kuvvetli bir şekilde eksprese ederken, diğerleri daha az eksprese ederler. AMH'yi en az eksprese edenler FSH'ye karşı en duyarlıdır ve bu nedenle, seçilmeye daha yatkındır. Bunun tersine, AMH'yi fazla eksprese edenlerin atreziye girmeleri kolaylaşacaktır ve bunlar FSH'ye daha dirençlidir (114,115).

Sonuç olarak, daha büyük antral folliküllerinde (6-8 mm ortalama çap) AMH ekspresyonundaki keskin azalma, gonadotropinin sikluslar arası yükselişi sırasında FSH tarafından sadece sınırlı sayıdaki follikülün seçilmesine izin veren bir fizyolojik ön koşul olarak görülebilir (116).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Etik Kurul İzin Süreci**

"Rekombinant FSH'nın IVF tedavisi uygulanan Polikistik Over Sendromu hastalarının follikül sıvılarından elde edilen granüloza hücrelerinde Konneksin 43 ve Aromataz aktivitesi üzerine etkisi" başlıklı tez çalışması, 22.02.2016 tarihinde GO 16/43 kayıt numarasıyla Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntem başlıklarında değerlendirme sonrası etik açıdan uygun bulunmuştur.

#### **3.2. Örneklerin Elde Edilmesi**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Tüp Bebek Ünitesi'ne infertilite nedeni ile başvuran 10 PKOS hastasından OPU (ovum pick up) sırasında elde edilen follikül sıvılarından oosit-kumulus kompleksi seçildikten sonra arda kalan follikül sıvıları EDTA'lı tüplere alınarak; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalına getirilmiştir.

##### **3.2.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hastalar**

20 - 25 yaş arasında ve vücut kitle indeksi 20-22 kg/m olan, rFSH kullanan PKOS (oligomenore ve anovulasyonu olan) hastaları araştırmaya dahil edilmiştir.

##### **3.2.2. Araştırmaya Almama Kriterleri**

Endometriozisi olan hastalar, sigara içenler, son 6 ay içinde hormon kullanan hastalar ve herhangi bir dahili veya metabolik hastalığı olanlar, araştırmaya dahil edilmemiştir.

#### **3.3. Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu**

HÜTF Histoloji – Embriyoloji A.D.'da follikül sıvıları (FS) 1:4 PBS ile dilüe edilmiştir. Daha sonra, 3 ml Ficoll (Sigma Histopaq 1077) solüsyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuştur ve üzerine 12 ml dilüe FS Ficoll solüsyonu ile karışmayacak şekilde yavaşça eklenmiştir. Granüloza hücreleri Ficoll solüsyonu ile

santrifüj (30 dk, 600 g) edilmiştir. Daha sonra yüzeyde kalan hücreler alınmıştır. Hücrelerin üzerine 5ml DMEM-F12 (Biowest L0092-500) besiyeri eklenerek santrifüj yapılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrar edildikten sonra hücre sayımı yapılmıştır. Daha sonra deney zamanına kadar hücreler dondurularak sıvı azot (-196°C) tankında bekletilmiştir (117).

### **3.4. Hücre Sayımı**

Granüloza hücrelerinden oluşan pellet üzerine 1 ml besiyeri eklendikten sonra, 100 µl'si alınmış ve üzerine 100 µl %4 tripan mavisi eklenmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak toma lamında hücre sayımı yapılmıştır (118). Elde edilen sayı  $10 \times 2 \times 10^4$  ile çarpılarak, toplam hücre miktarı belirlenmiştir.

### **3.5. Hücrelerin Dondurulması**

Santrifüj sonrasası elde edilen hücre peletleri üzerine 7 µl DMEM-F12, 2 µl Fetal Bovin Serum (FBS) ve 1 µl Dimethyl sulfoxide (DMSO) eklenerek (buz üzerinde), 2 saat boyunca 4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra 2 saat -20°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır.

### **3.6. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi**

Azot tankında bulunan hücreler alınarak hızlı bir şekilde 37°C'de su banyosuna konulmuştur. Kültür laboratuvarında önceden hazırlanmış besiyere 1/9 oranında eklenerek santrifüj (1200 rpm, 5 dakika) edilmiştir. Daha sonra elde edilen peleti besiyer ile karıştırarak hücreler kültüre hazır hale getirilmiştir.

### **3.7. Besiyerlerin Hazırlanması**

24 saat'lik kültür için DMEM-F12 besiyerine %10 FBS ve %1 Penisilin Streptomisin eklenmiştir. Bu besiyeri hücrelerin normal kültürü sırasında kullanılmıştır. 2 saat'lik deney süresi boyunca serum-free besiyeri kullanılmıştır. Serum-free besiyerinde DMEM-F12 üzerine sadece %1 Penisilin Streptomisin eklenmiştir (104).

### 3.8. Deney Grupları

Her hastaya ait hücreler 4 farklı deney ve kontrol grubuna ayrılmıştır. Grupların tümü 24 saat DMEM-F12, %10 FBS ve %1 Penisilin Streptomisin besiyeriyle kültür kaplarına tutunmaları için kültüre edilmiştir. Daha sonra hücrelerin üzerindeki supernatant alınarak 2 saat boyunca serum free mediumuyla birlikte farklı karışımlarla kültüre edilmişlerdir. A grubu kontrol grubu olarak sadece besiyeri eklenerek kültüre edilmiştir. B grubunda hücrelere kültür medyumuna 10 ng/ml rFSH (Merck Serono Follitropin alfa / Gonal-F 450 IU/0.75 ml) eklenerek kültüre edilmiştir. C grubunda kültür medyumuna 10 mikro g/ml AMHR2 Antikoru (Anti-AMHR2 antibody [MIG7] ab64762) eklenerek hücrelere kültüre edilmiştir. D grubu kültür medyumuna 10 ng/ml rFSH + 10 mikro g/ml AMHR2 Ab eklenerek kültüre edilmiştir (Çizelge 3.1).

**Tablo 3.1.** Deney grupları

Gruplar	Serum free medium	rFSH 10 ng/ml	AMHR2 Ab 10 mikro g/ml
A	Var	Yok	Yok
B	Var	Var	Yok
C	Var	Yok	Var
D	Var	Var	Var

### 3.9. Hücre Kültürü

İmmünoflüresan yöntemi için hücre kültürü Poly-L-lysine kaplı 8-kuyucuklu kültür lamaları kullanılmıştır. Her kuyucuğa  $5 \times 10^4$  hücre ekilmiştir. Hücre kültürü %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'da yapılmıştır. İlk 24 saat'lik aşamada hücrelerin tutunması sağlanmıştır ve bu aşama için DMEM-F12, %10 FBS ve %1 Penisilin Streptomisin mediumu kullanılmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerindeki supernatant alınarak 2 saat boyunca serum free mediumla birlikte farklı karışımlarla kültüre edilmiştir. 2 saat kültür sonunda hücreler İmmünoflüresan boyama yöntemiyle Cx43 değerlendirmesi için boyanmıştır.

### **3.10. İmmünoflüresan Yöntemiyle Cx43 Değerlendirilmesi**

#### **3.10.1. Hücrelerin Fiksasyonu**

Kültürden alınan hücreler PBS (Biowest Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline L0615-500) solüsyonu ile 3 kere yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit ile 20 dakika boyunca fikse edilmişlerdir. Daha sonra PBS ile yıkanarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

#### **3.10.2. Permeabilizasyon**

Hücre zarlarını geçirgen hale getirmek için 10 dakika boyunca %0.1 Triton X (Sigma T8787) kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır.

#### **3.10.3. Serum Blokajı**

Hücreler bu aşamada %5 keçi serumu (Sigma Goat serum G9023) ile 1 saat boyunca muamele edilmiştir. 1 saatin sonunda hücreler yıkanmadan diğer aşamaya geçilmiştir.

#### **3.10.4. Primer Antikor Uygulaması**

Mouse monoclonal Cx43 antikor (Anti-Connexin 43 / GJA1 antibody [4E6.2] ab79010) 1:100 dilisyonla +4°C'de gece boyunca uygulanmıştır. Bu aşamanın sonunda hücreler PBS ile yıkanarak diğer aşama için hazır hale gelmişlerdir.

#### **3.10.5. FITC Konjuge Sekonder Antikor Uygulaması**

FITC konjuge Goat anti mouse (Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) ab6785) (Ex: 493 nm, Em: 528 nm) sekonder antikor'u 1:1000 dilisyonla 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda uygulanmıştır. Daha sonra PBS ile yıkanarak bir sonraki aşama için hazırlanmıştır.

### 3.10.6. Çekirdek Boyası

Çekirdek boyası için karanlık odada 10 dakika boyunca 300 nmol BioLegend marka DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindole, Dilactate 422801) (Ex: 360 nm) uygulanmıştır. Daha sonra hücreler yıkanarak kurutulup lamel ile kapatılmıştır.

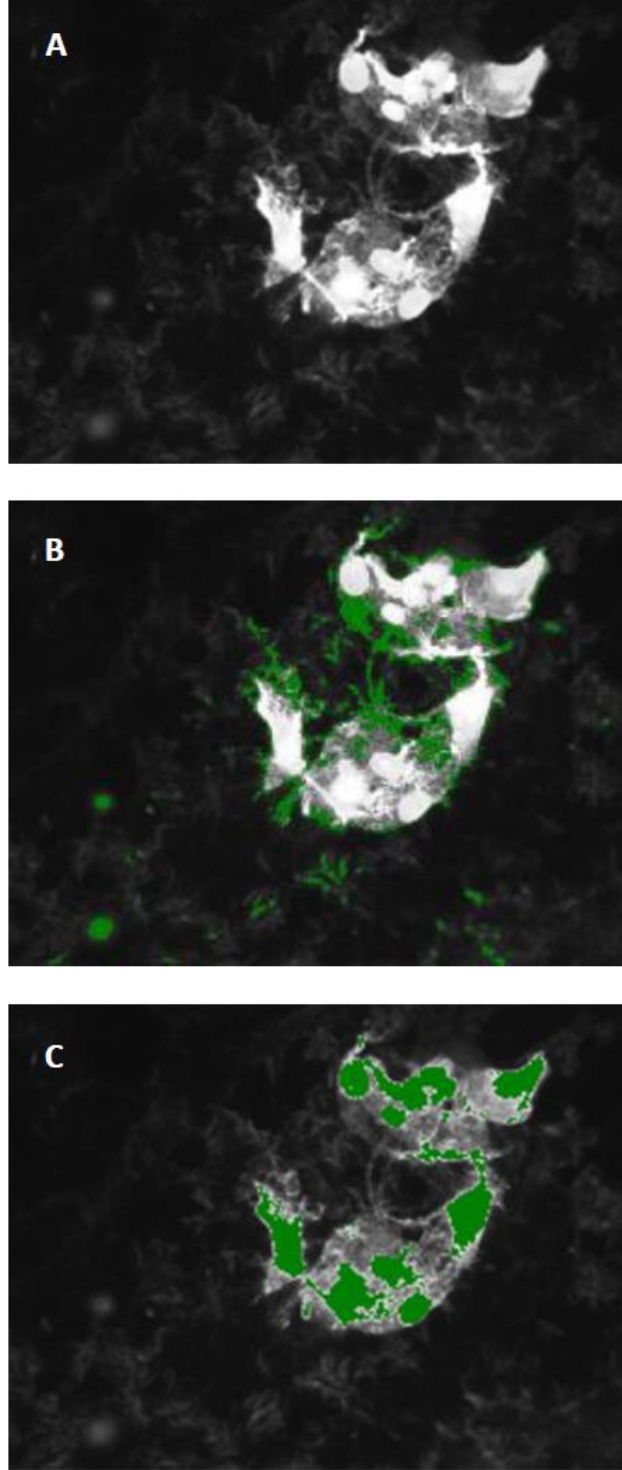
### 3.10.7. Görüntüleme

Örnekler görüntüleme laboratuvarında Leica DM6000B upright ışık ve widefield floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Çalışmada mikroskobun floresan görüntüleme kısmı kullanılarak x40 objektif kullanılarak x400 büyütmede mikrograflar alınmıştır.

### 3.11. Mikrografların Değerlendirilmesi

Her gruba ait hücrelerin 4 farklı alanı seçilerek x40 objektikle mikrograflar alınmıştır. Her alandan FITC, DAPI ve merge mikrograflar alınmıştır. Daha sonra Lasx programı kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz için merge yapılmış mikro graflar kullanılarak, ilk önce 50 – 100 intensite aralığında toplam Cx43 ekspresyon alanı (yeşil renk) mikrometre kare olarak hesaplanmıştır. Daha sonra 101 ve üzeri intensite'de çekirdeklerin toplam alanı (mavi renk) mikrometre kare olarak hesaplanmıştır. Cx43 için elde edilen değerler, Cx43 ve DAPI değerlerinin toplamına bölünerek ve daha sonra 100'e çarpılarak, Cx43 ekspresyon yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 3.1).

%0-25 arası değerler 0 skor olarak hesaplanırken, %26-40 arası +1, %41-55 arası +2, %56-70 arası +3 ve %71'den fazla olan değerler +4 boyama şiddeti olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.1.** x40 objektif kullanılarak çekilen mikrografta insan granüloza hücrelerinde intensite ölçümü. (A), bulunan ana görüntü üzerinde Cx43 (B) ve DAPI (C) alanları farklı intensiti ile ölçülmüştür.

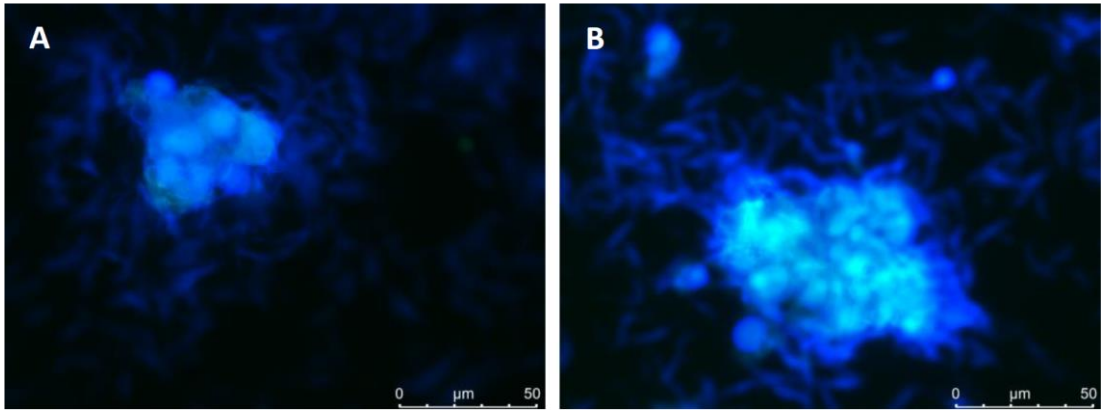
### 3.12. İstatistik Analiz

Farklı ilaçların boyanma oranları arasındaki karşılaştırmalar Friedman testi kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu ise Shapiro Wilk testi ile incelenmiş ve normal dağılım varsayımının bozulduğu görülmüştür. Bu sebeple analizler parametrik olmayan yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Friedman testi sonucunda anlamlı farklılık bulunması durumunda ikili karşılaştırmalar ile farklılığı yaratan gruplar tespit edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi (p-değeri) 0.05 olarak alınmıştır. Analizler SPSS 21 programında uygulanmıştır.

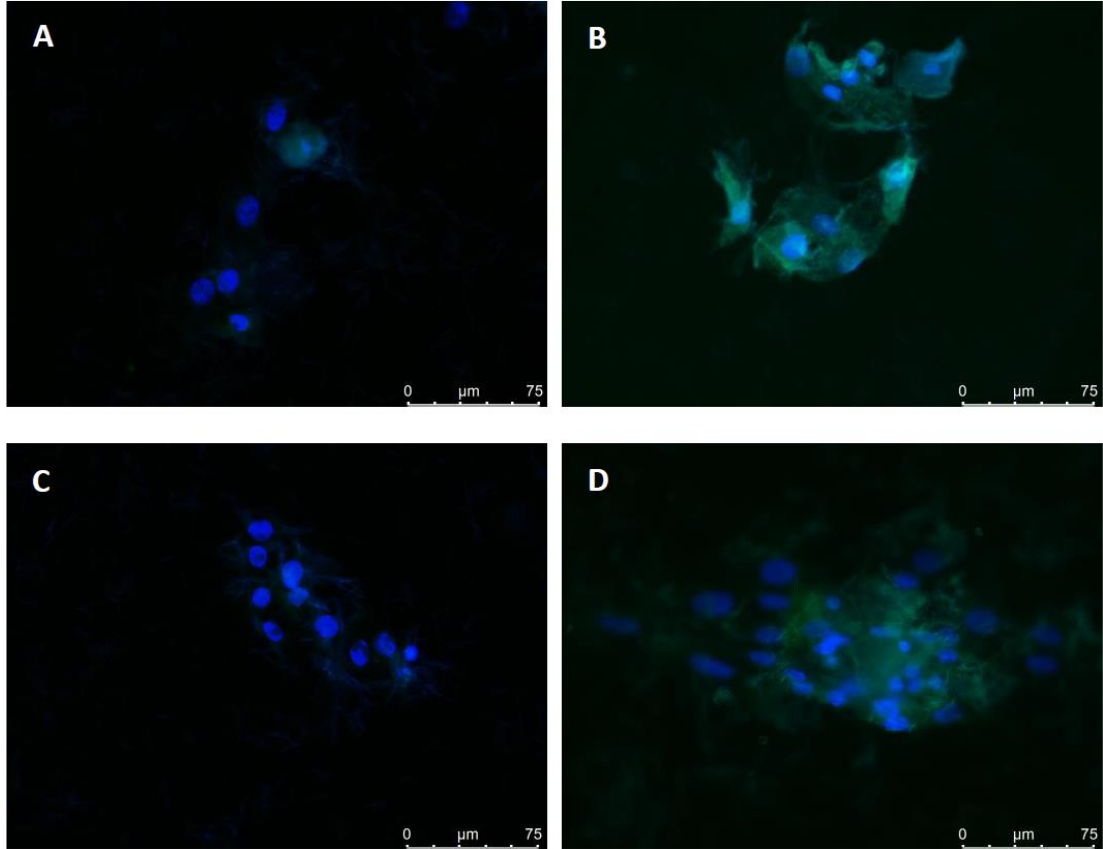


#### 4. BULGULAR

Cx43 için ilk önce pozitif ve negatif kontrol boyamalarda insan granüloza hücrelerinde Cx43 ekspresyonu şekil 4.1’de gösterilmiştir. Daha sonra farklı gruplar arasındaki Cx43 ekspresyon farkı değerlendirilmiştir (Şekil 4.2). Yapılan analizlerin sonucu farklı gruplar arası fark olup olmadığı araştırılmıştır. Her deney grubu için Cx43 ekspresyon alanı hesaplanarak, Cx43 ve DAPI değerlerinin toplamına bölünerek ve daha sonra 100’e çarpılarak, Cx43 ekspresyon yüzdesi hesaplanmıştır. %0-25 arası değerler 0 skor olarak hesaplanırken, %26-40 arası +1, %41-55 arası +2, %56-70 arası +3 ve %71’den fazla olan değerler +4 boyama şiddeti olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.1). Daha sonra elde edilen ekspresyon yüzdelerinin ortalaması alınarak gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır (Tablo 4.2 ve Şekil 4.3). Cx43 ekspresyon şiddeti açısından gruplar arasında fark olup olmadığı araştırılmıştır (Tablo 4.2 ve Şekil 4.4).



**Şekil 4.1.** x63 objektifte çekilen normal insan granüloza hücrelerinde Cx43 negatif (A) ve pozitif (B) mikrograflar. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanıdır.



**Şekil 4.2.** x40 objektifle çekilen farklı gruplarda granüloza hücreleri. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanınıdır. A, kontrol, B, FSH verilen, C, AMHR2 Ab verilen ve D, FSH+AMHR2 Ab verilen gruptur. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanınıdır.

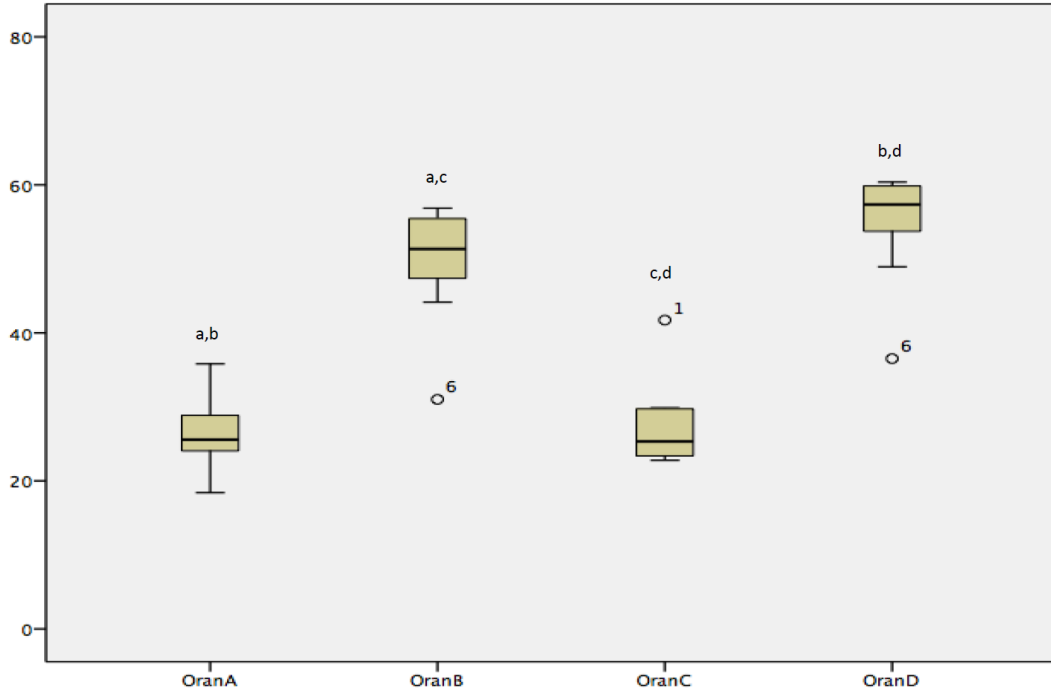
**Tablo 4.1.** Deney ve kontrol gruplarında Cx43 oranı ve boyama şiddeti

Deney	Oran %				Boyama şiddeti			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	35,81	51,50	41,73	56,40	+1	+2	+2	+3
2	24,86	55,70	26,21	58,29	0	+3	+1	+3
3	24,06	55,44	24,35	59,85	0	+3	0	+3
4	23,83	44,14	24,53	48,93	0	+2	0	+2
5	28,85	51,31	29,88	54,77	+1	+2	+1	+2
6	18,41	31,02	22,78	36,52	0	+1	0	+2
7	29,04	56,86	26,13	59,66	+1	+3	+1	+3
8	26,29	51,38	23,11	59,94	+1	+2	0	+3
9	24,52	50,91	23,38	60,37	0	+2	0	+3
10	28,21	47,38	29,74	53,73	+1	+2	+1	+2

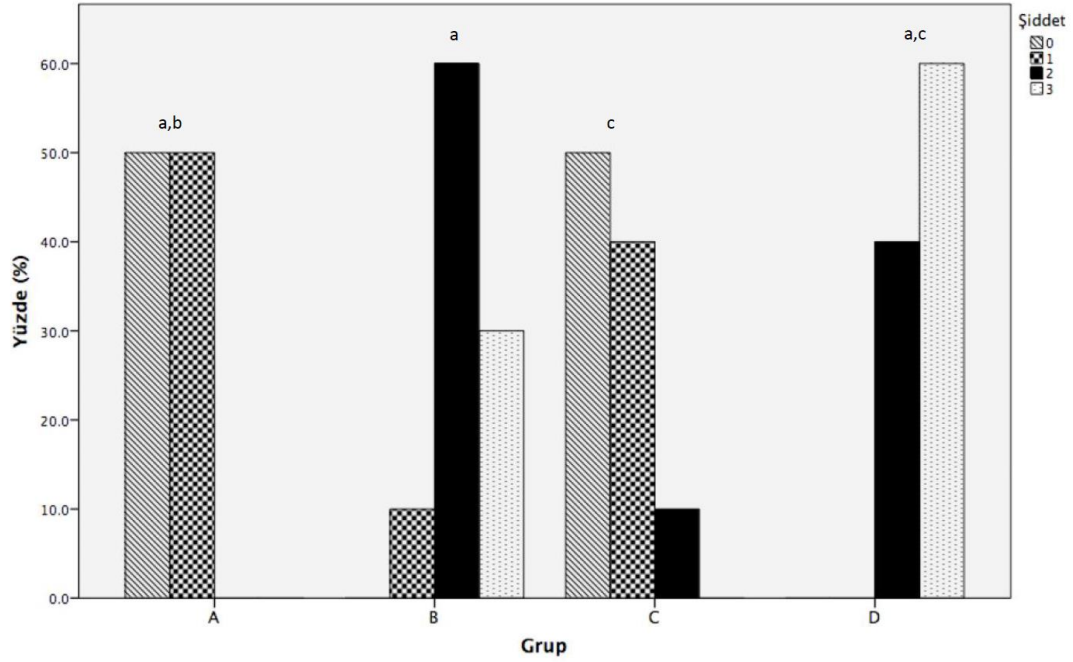
**Tablo 4.2.** Farklı gruplarda eksprese edilen Cx43 yüzde oranı

Deney grupları	Hasta Sayısı	Ortalama [Min-Max] %	Median%	Std. Deviasyon
A	10	26,38 [18,41 – 35,80] <sup>a,b</sup>	25,58	4,55
B	10	49,56 [31,01 – 56,85] <sup>a,c</sup>	51,34	7,57
C	10	27,18 [22,77 – 41,72] <sup>c,d</sup>	25,33	5,71
D	10	54,84 [36,52 – 60,37] <sup>b,d</sup>	57,34	7,39

A ve B grubu arasında (P=0.011) anlamlı fark bulunmuştur. A ve D grubu arasında (P=0.001) anlamlı fark bulunmuştur. B ve C grubu arasında (P=0.026) anlamlı fark bulunmuştur. C ve D grubu arasında (P=0.002) anlamlı fark bulunmuştur.



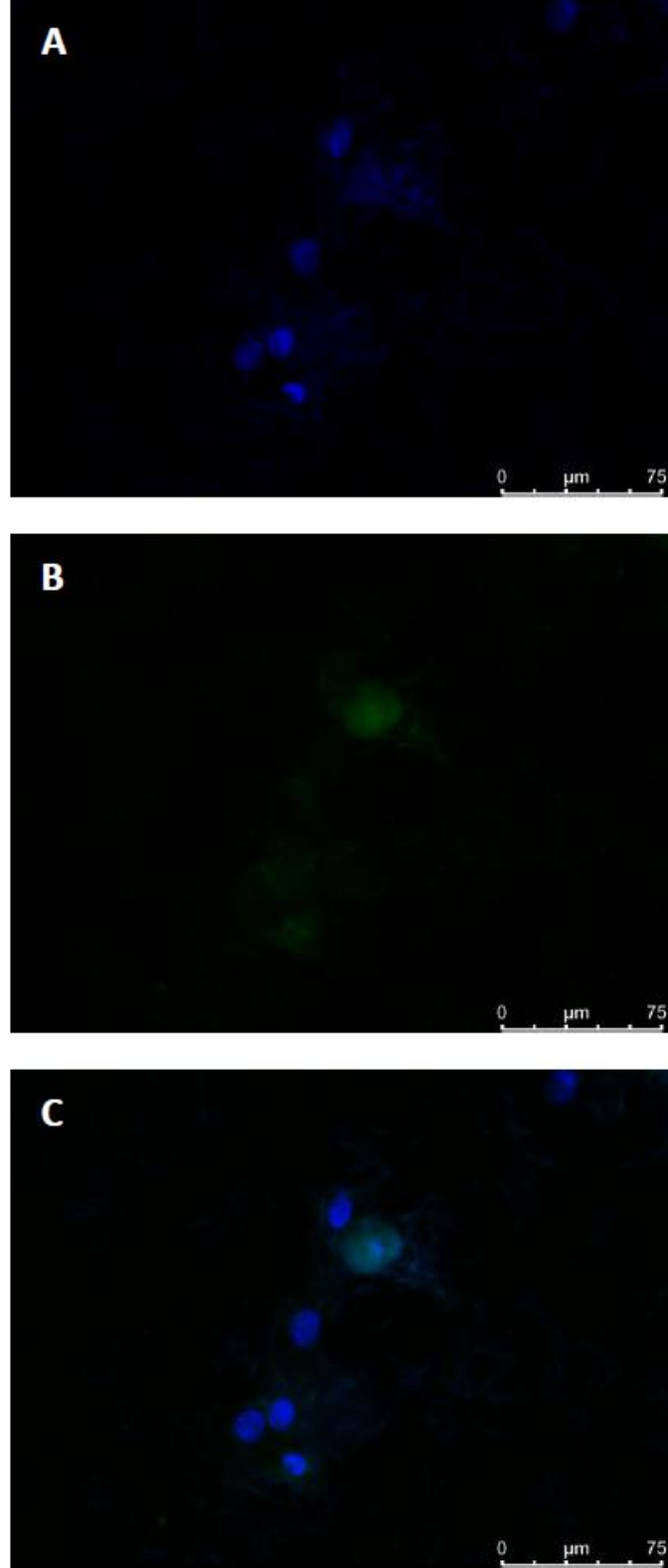
**Şekil 4.3.** Deney ve kontrol grupları arasında eksprese edilen Cx43 yüzde oranı. A ve B grubu arasında (P=0.011) anlamlı fark bulunmuştur. A ve D grubu arasında (P=0.001) anlamlı fark bulunmuştur. B ve C grubu arasında (P=0.026) anlamlı fark bulunmuştur. C ve D grubu arasında (P=0.002) anlamlı fark bulunmuştur.



**Şekil 4.4.** Deney ve kontrol grupları arasında eksprese edilen Cx43 şiddeti. A ve B grubu arasında ( $P=0.019$ ) anlamlı fark bulunmuştur. A ve D grubu arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. C ve D grubu arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur.

#### 4.1. Kontrol Gruplarındaki Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu

10 hastadan izole edilen granüloza hücreleri üzerinde kültür ortamında hiç bir ilaç uygulamadan Cx43 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Kontrol grubu için elde edilen mikrograflar (Şekil 4.5) Cx43 boyanma oranını hesaplamak için kullanılmıştır. Bu gruptaki hastalarda Cx43 ortalama boyanma yüzde oranı %26,38 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Ayrıca boyanma şiddeti olarak bu grupta 5 hastada 0 boyanma şiddeti ve diğer 5 hastada +1 boyanma şiddeti tespit edilmiştir (Tablo 4.3).



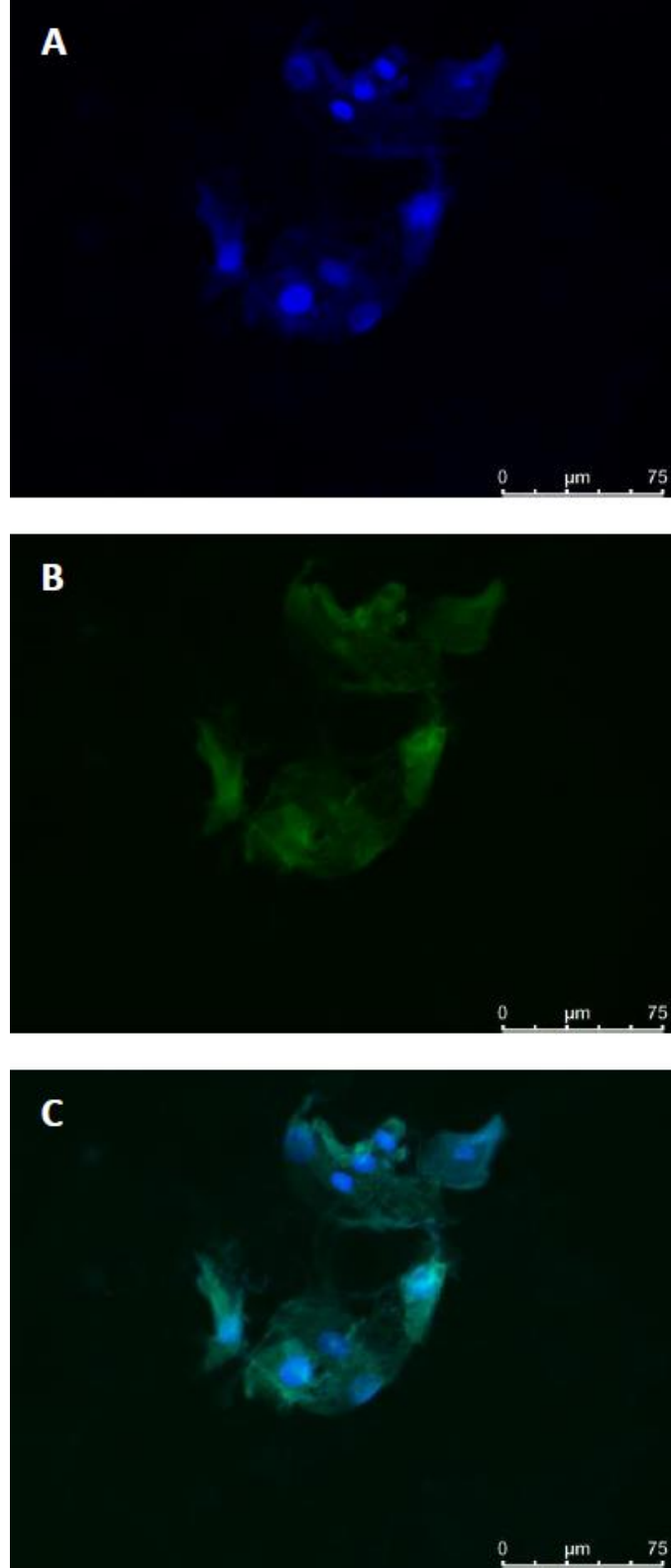
**Şekil 4.5.** x40 objektifle çekilen kontrol gruplarında granuloza hücreleri. A, DAPI, B, Cx43 FITC ve C birleşmiş mikrograflardır. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanıdır.

**Tablo 4.3.** Kontrol grubu Cx43 boyanma şiddeti

	Şiddet	Frekans	Yüzde%
A Grubu	0	5	50
	1	5	50
	2	0	0
	3	0	0

#### 4.2. FSH Varlığında Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu

10 hastadan izole edilen granüloza hücreleri üzerinde kültür ortamında FSH uyguladıktan sonra Cx43 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Bu grup için elde edilen mikrograflar (Şekil 4.6) Cx43 boyanma oranını hesaplamak için kullanılmıştır. Bu gruptaki hastalarda Cx43 ortalama boyanma yüzde oranı %49,56 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Ayrıca boyanma şiddeti olarak bu grupta 1 hastada +1 boyanma şiddeti, 6 hastada +2 ve 3 hastada +3 boyanma şiddeti tespit edilmiştir (Tblo 4.4).



**Şekil 4.6.** x40 objektifle çekilen FSH uygulanan grupta granüloza hücreleri. A, DAPI, B, Cx43 FITC ve C birleşmiş mikrograflardır. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanıdır.

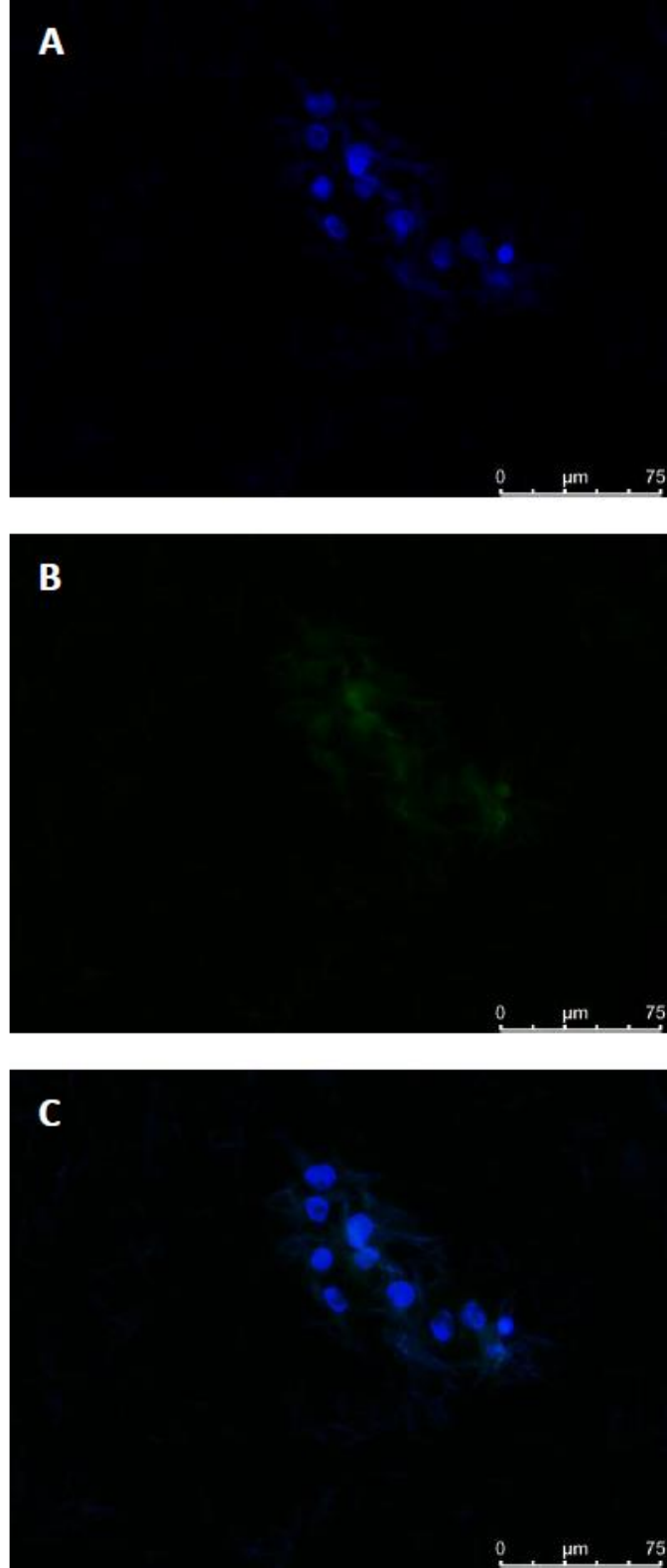
**Tablo 4.4.** FSH verilen grup için Cx43 boyanma şiddeti

	Şiddet	Frekans	Yüzde%
B Grubu	0	0	0
	1	1	10
	2	6	60
	3	3	30

### 4.3. AMHR2 Ab Varlığında Granüloza Hücrelerinde Cx43 Ekspresyonu

10 htadadan izole edilen granüloza hücreleri üzerinde kültür ortamında AMHR2 Ab uyguladıktan sonra Cx43 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Bu grubu için elde edilen mikrograflar (Şekil 4.7) Cx43 boyanma oranını hesaplamak için kullanılmıştır. Bu gruptaki hastalarda Cx43 ortalama boyanma yüzde oranı %27,18 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Ayrıca boyanma şiddeti olarak bu grupta 5 hastada 0 boyanma şiddeti, 4 hastada +1 ve 1 hastada +2 boyanma şiddeti tespit edilmiştir (Tblo 4.5).





**Şekil 4.7.** x40 objektifle çekilen AMHR2 uygulanan grupta granuloza hücreleri. A, DAPI, B, Cx43 FITC ve C birleşmiş mikrograflardır. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanıdır.

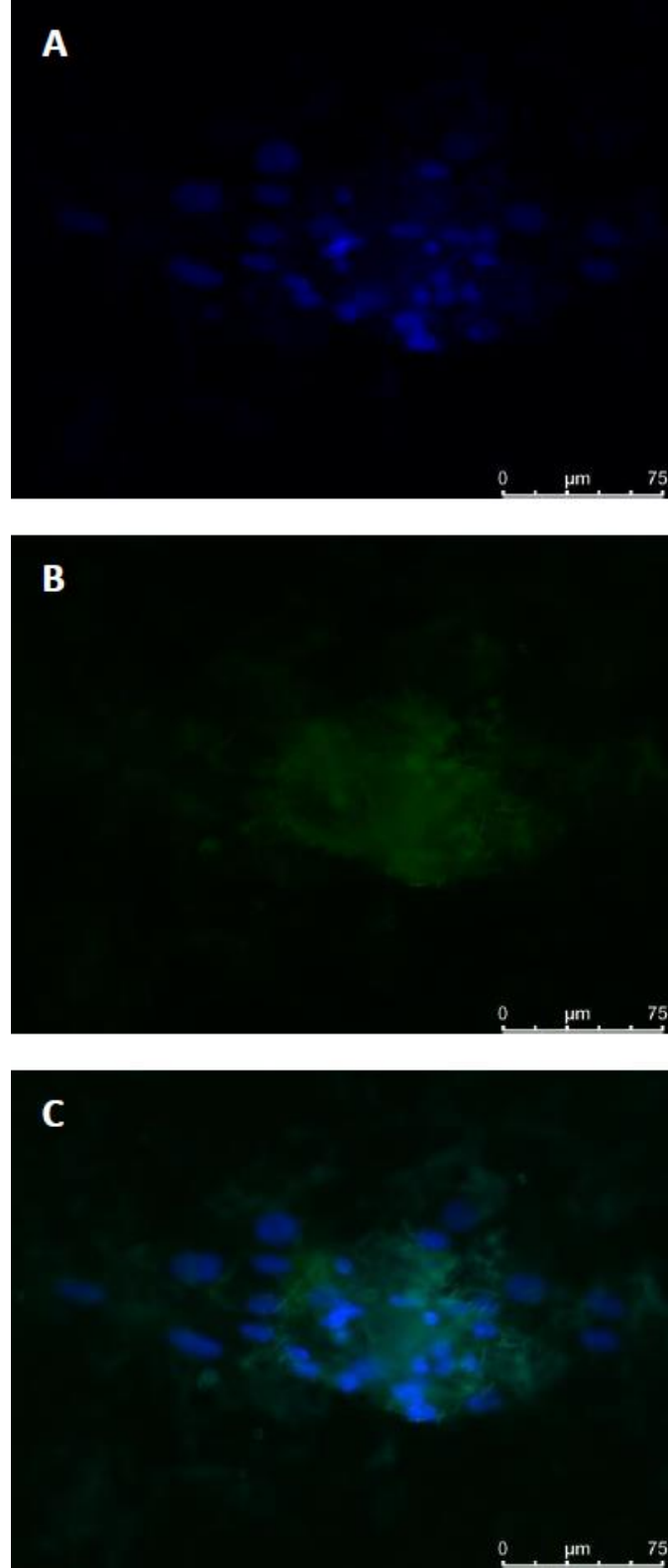
**Tablo 4.5.** AMHR2 Ab verilen grup için Cx43 boyanma şiddeti

	Şiddet	Frekans	Yüzde%
C Grubu	0	5	50
	1	4	40
	2	1	10
	3	0	0

#### 4.4. FSH ve AMHR2 Ab Varlığında Granüloza Hücrelerinde Cx43

##### Ekspresyonu

10 hastadan izole edilen granüloza hücreleri üzerinde kültür ortamında FSH ve AMHR2 Ab uyguladıktan sonra Cx43 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Bu grup için elde edilen mikrograflar (Şekil 4.8) Cx43 boyanma oranını hesaplamak için kullanılmıştır. Bu gruptaki hastalarda Cx43 ortalama boyanma yüzde oranı %54,84 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Ayrıca boyanma şiddeti olarak bu grupta 4 hastada +2 boyanma şiddeti ve 6 hastada ++ boyanma şiddeti tespit edilmiştir (Tablo 4.6).



**Şekil 4.8.** x40 objektifle çekilen FSH ve AMHR2 Ab uygulanan gruplarda granüloza hücreleri. A, DAPI, B, Cx43 FITC ve C birleşmiş mikrograflardır. Yeşil renk Cx43 ve mavi renk çekirdek alanıdır.

**Tablo 4.6.** FSH ve AMHR2 Ab verilen grup için Cx43 boyanma şiddeti

	Şiddet	Frekans	Yüzde%
D Grubu	0	0	0
	1	0	0
	2	4	40
	3	6	60

Yapılan değerlendirmelerin sonucunda hem Cx43 boyanma oranı ve hemde şiddeti açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Kontrol ve FSH verilen grup arasında ( $P=0.011$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve FSH+AMHR2 Ab verilen grup arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. FSH ve AMHR2 Ab verilen grup arasında ( $P=0.026$ ) anlamlı fark bulunmuştur. AMHR2 Ab ve FSH+AMHR2 Ab verilen grup arasında ( $P=0.002$ ) anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.2 ve Şekil 4.3).

Ayrıca boyanma şiddeti açısından Kontrol ve FSH verilen grup arasında ( $P=0.019$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve FSH+AMHR2 Ab verilen grup arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. AMHR2 Ab ve FSH+AMHR2 Ab verilen grup arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 4.4).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada FSH'nın, PKOS hastalarından izole edilen insan granüloza hücrelerindeki Cx43 ekspresyonu üzerine etkisi gösterilmiştir. PKOS hastası olmayan normal insan ve fare granüloza hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda FSH'nın etkisi granüloza hücrelerinde Cx43 üzerinde gösterilmiştir (119). FSH kültür ortamında tek başına uygulandığı zaman çok kısa bir süre etkisini sürdürdüğü için bizim çalışmamızda sadece 2 saat boyunca FSH uygulanmıştır. Bu 2 saat içinde FSH granüloza hücreleri üzerinde cAMP/PKA yolağını kullanarak Cx43 artışını sağlamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada PKOS hastalarında elde edilen granüloza hücreleri üzerinde kültür ortamında uygulanan FSH, bu hücrelerde insülin reseptörü substratı-2 (IRS-2) ekspresyonunu arttırdığını gösterilmiştir. IRS-2 cAMP/SP1 yolağı üzerinden aktive edilmiştir (25). Bizim çalışmamızda Cx43 artışı ile, FSH'nın PKOS hastalarından elde edilen graüloza hücrelerinde, normal granüloza hücrelerinde olduğu gibi Cx43 yolağını aktive ettiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre FSH uygulanan grup ile kontrol grubu arasında Cx43 ekspresyonu açısından anlamlı bir artış gösterilmiştir. Bu artış 2 saat'lik bir kültür sonrası gösterilmiştir. Kültür süresinin uzamasıyla, FSH etkisinin azalacağı düşünülmektedir. Cx43'ün yarı ömrü kültür ortamında 1-5 saat arasında (119) olduğu için FSH etkilerini görmek için kültür süresi kısa tutulmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda FSH'nın etkisini daha fazla sürdürebilmesi için TGFβ-1 ile beraber uygulanması önerilmiştir. TGFβ-1, tek başına uygulandığı zaman Cx43 ekspresyonu üzerine bir etkisi bulunmamıştır, ama FSH ile beraber kullanıldığı zaman 24 saat kültür ortamında FSH'nın etkisini sürdürmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (119,120). İlerdeki çalışmalarda kültür süresini arttırmak ve dolayısıyla FSH etkisini daha iyi anlamak için FSH+TGFβ-1 kullanılmasını önerebiliriz.

Bizim çalışmamızda AMHR2 Ab, tek başına uygulanan grup ile kontrol grubu arasında Cx43 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ama FSH ve AMHR2 Ab uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur. FSH ve AMHR2 Ab uygulanan grup ve sadece FSH verilen grup arasında istatistiksel

olarak fark bulunmamıştır. Fark bulunmamasına rağmen elde edilen sonuçlarda az miktarda olsa da FSH ve AMHR2 Ab verilen grupta Cx43 ekspresyon miktarı daha fazla bulunmuştur. Bu da AMHR2 AK, verilen gruplarda FSH etkisinin yanısıra AMHR2 Ab etkisinin de olduğunu göstermektedir. Gelecek çalışmalarda bu konu üzerinde kültür süresini arttırarak veya AMHR2 Ab uygulama miktarını doz ve zaman açısından arttırarak daha iyi sonuçlar alınabileceğine inanmaktayız.

Bizim çalışmamızda FSH uygulanan PKOS hastalarının granüloza hücrelerinde Cx43 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç üzerinden IVF tedavisi sırasında elde edilen oosit-kumulus komplekslerinin denudasyon işlemine kadar olan kültür süreçlerinde kültür sıvılarına rFSH eklenmesinin oosit maturasyonu, kalitesi ile embriyo kalitesi üzerinde olumlu etkisi olabileceği hipotezi üzerinden devam eden yeni çalışmalar planlamaktayız.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada hem Cx43 boyanma oranı ve hem de şiddeti açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Kontrol ve FSH verilen grup arasında ( $P=0.011$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. FSH ve AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0.026$ ) anlamlı fark bulunmuştur. AMHR2 ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0.002$ ) anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.2 ve Şekil 4.3). Ayrıca boyanma şiddeti açısından Kontrol ve FSH verilen grup arasında ( $P=0.019$ ) anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur. AMHR2 ve FSH+AMHR2 verilen grup arasında ( $P=0.001$ ) anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 4.4).

Sonuç olarak elde edilen bu veriler, rFSH'nin PKOS hastalarında granüloza hücreleri üzerine etki ettiğini ve Cx43 ekspresyonunu arttırarak, granüloza hücreleri arasındaki iletişimi arttırdığını göstermektedir.

İlerdeki çalışmalarda kültür süresini arttırmak ve dolayısıyla FSH etkisini daha iyi anlamak için FSH+TGF $\beta$ -1 kullanılmasını önerebiliriz. Ayrıca gelecek çalışmalarda bu konu üzerinde kültür süresini arttırarak veya AMHR2 Ab uygulama miktarını doz ve zaman açısından arttırarak daha iyi sonuçlar alınabileceğine inanmaktayız.

Çalışmamızın sonucunda FSH uygulanan PKOS hastalarının granüloza hücrelerinde Cx43 aktivitesinin artması gösterilmiştir. Bu sonuç üzerinden IVF tedavisi sırasında elde edilen oosit-kumulus komplekslerinin denudasyon işlemine kadar olan kültür süreçlerinde kültür sınırlarına rFSH eklenmesinin oosit maturasyonu, kalitesi ile embriyo kalitesi üzerinede olumlu etkisi olabileceği hipotezi üzerinden devam eden yeni çalışmalar planlamaktayız.

## 7. KAYNAKLAR

1. Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Reviews in molecular medicine*. 2008 Jan;10.
2. Dumont A, Robin G, Catteau-Jonard S, Dewailly D. Role of Anti-Müllerian Hormone in pathophysiology, diagnosis and treatment of Polycystic Ovary Syndrome: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015 Dec 21;13(1):137.
3. Wang HX, Gillio-Meina C, Chen S, Gong XQ, Li TY, Bai D, Kidder GM. The canonical WNT2 pathway and FSH interact to regulate gap junction assembly in mouse granulosa cells. *Biology of reproduction*. 2013 Aug 1;89(2):39-1.
4. Talhouk R, Tarraf C, Kobrossy L, Shaito A, Bazzi S, Bazzoun D, El-Sabban M. Modulation of Cx43 and gap junctional intercellular communication by androstenedione in rat polycystic ovary and granulosa cells in vitro. *Journal of reproduction & infertility*. 2012 Jan;13(1):21.
5. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, Lizneva D, Natterson-Horowitz B, Teede HJ, Yildiz BO. Polycystic ovary syndrome. *Nature reviews. Disease primers*. 2016 Aug;2:16057-.
6. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Jun;91(6):2100-4.
7. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, Teede HJ. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. *Human reproduction*. 2013 Jan 12;28(3):777-84.
8. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 1989 Sep 1;38(9):1165-74.
9. Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*. 2012 Jul 4;18(6):618-37.
10. Veltman-Verhulst SM, Boivin J, Eijkemans MJ, Fauser BJ. Emotional distress is a common risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of 28 studies. *Human reproduction update*. 2012 Jul 23;18(6):638-51.
11. Moran LJ, Deeks AA, Gibson-Helm ME, Teede HJ. Psychological parameters in the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Human reproduction*. 2012 Apr 4;27(7):2082-8.
12. Cussons AJ, Watts GF, Burke V, Shaw JE, Zimmet PZ, Stuckey BG. Cardiometabolic risk in polycystic ovary syndrome: a comparison of different



approaches to defining the metabolic syndrome. *Human Reproduction*. 2008 Jul 16;23(10):2352-8.

13. Lerchbaum E, Schwetz V, Giuliani A, Obermayer-Pietsch BR. Influence of a positive family history of both type 2 diabetes and PCOS on metabolic and endocrine parameters in a large cohort of PCOS women. *European journal of endocrinology*. 2014 Mar 3:EJE-13.
14. Banaszewska B, Spaczynski RZ, Pelesz M, Pawelczyk L. Incidence of elevated LH/FSH ratio in polycystic ovary syndrome women with normo-and hyperinsulinemia. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2003;48(1):131-4.
15. Solorzano B, McCartney CR, Blank SK, Knudsen KL, Marshall JC. Hyperandrogenaemia in adolescent girls: origins of abnormal gonadotropin-releasing hormone secretion. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2010 Jan 1;117(2):143-9.
16. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. *Endocrine reviews*. 2015 Oct 1;36(5):487-525.
17. Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2008 Nov 30;19(9):340-7.
18. Valkenburg O, Uitterlinden AG, Piersma D, Hofman A, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC, Laven JS. Genetic polymorphisms of GnRH and gonadotrophic hormone receptors affect the phenotype of polycystic ovary syndrome. *Human reproduction*. 2009 Apr 29;24(8):2014-22.
19. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology*. 2007 May;148(5):2301-8.
20. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *The Lancet*. 2003 Sep 27;362(9389):1017-21.
21. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Falcon de Vargas A, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998 Jun 1;83(6):2001-5.
22. McAllister JM, Legro RS, Modi BP, Strauss JF. Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015 Mar 31;26(3):118-24.

23. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine reviews*. 2012 Oct 12;33(6):981-1030.
24. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertility and sterility*. 2011 Nov 30;96(5):1246-51.
25. Anjali G, Kaur S, Lakra R, Taneja J, Kalsey GS, Nagendra A, Shrivastav TG, Devi MG, Malhotra N, Kriplani A, Singh R. FSH stimulates IRS-2 expression in human granulosa cells through cAMP/SP1, an inoperative FSH action in PCOS patients. *Cellular signalling*. 2015 Dec 31;27(12):2452-66.
26. Stocco C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*. 2008 May 31;73(5):473-87.
27. Winterhager E, Kidder GM. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human reproduction update*. 2015 Feb 9;21(3):340-52.
28. Chen H, Zhao L, Chu G, Kito G, Yamauchi N, Shigeyoshi Y, Hashimoto S, Hattori MA. FSH induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via a gap junction protein Cx43-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013 Mar 15;304(6):E566-75.
29. Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell communication & adhesion*. 2003 Jan 1;10(4-6):173-80.
30. Abascal F, Zardoya R. Evolutionary analyses of gap junction protein families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2013 Jan 31;1828(1):4-14.
31. Yeager M, Harris AL. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Current opinion in cell biology*. 2007 Oct 31;19(5):521-8.
32. Koval M, Molina SA, Burt JM. Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. *FEBS letters*. 2014 Apr 17;588(8):1193-204.
33. Harris AL, Contreras JE. Motifs in the permeation pathway of connexin channels mediate voltage and Ca<sup>2+</sup> sensing. *Frontiers in physiology*. 2014;5.
34. Li TY, Colley D, Barr KJ, Yee SP, Kidder GM. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *Journal of cell science*. 2007 Dec 1;120(23):4117-25.
35. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochemical Journal*. 2006 Jul 1;397(1):1-4.
36. Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Agullo E, Stahlhofen S, Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, Jorge I, Torre I, Vazquez J, Boengler K, Schulz R. Connexin43 in

- cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovascular research*. 2009 May 21;83(4):747-56.
37. Hatakeyama T, Dai P, Harada Y, Hino H, Tsukahara F, Maru Y, Otsuji E, Takamatsu T. Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70. *Scientific reports*. 2013;3.
  38. Moorby C, Patel M. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Experimental cell research*. 2001 Dec 10;271(2):238-48.
  39. Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ, Winterhager E. Connexin43 interacts with NOV A possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Aug 27;279(35):36931-42.
  40. Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2010 Apr 30;88(4):399-413.
  41. Gittens JE, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci*. 2005 Jan 1;118(1):113-22.
  42. Veitch GI, Gittens JE, Shao Q, Laird DW, Kidder GM. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *Journal of cell science*. 2004 Jun 1;117(13):2699-707.
  43. Wang HX, Tong D, El-Gehani F, Tekpetey FR, Kidder GM. Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009 May 1;13(5):972-84.
  44. Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. *Molecular Endocrinology*. 2008 Dec 1;22(12):2643-54.
  45. Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis*. 2005 May 1;10(3):459-69.
  46. Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu T. Cx43 mediates TGF- $\beta$  signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Molecular Biology of the cell*. 2007 Jun 1;18(6):2264-73.
  47. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*. 2006 Mar 15;394(3):527-43.
  48. Weakley BS. Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of anatomy*. 1966 Jul;100(Pt 3):503.
  49. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews*. 1994 Dec;15(6):707-24.

50. Billig H, Furuta IT, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993 Nov;133(5):2204-12.
51. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *Journal of Clinical Investigation*. 1998 Jun 15;101(12):2622.
52. Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao HT, Tsai MY, Chang C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Aug 3;101(31):11209-14.
53. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Jan 3;103(1):224-9.
54. Lenie S, Smitz J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biology of reproduction*. 2009 Apr 1;80(4):685-95.
55. Hillier SG, Tetsuka M, Fraser HM. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1997 Jan 1;12(1):107-11.
56. Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, di Clemente N. Anti-Mullerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008 Nov;93(11):4456-61.
57. 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 Mar;92(3):1034-40.
58. Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine reviews*. 2015 Feb 1;36(1):1-24.
59. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*. 1996 Apr;17(2):121-55.
60. Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Hormone Research in Paediatrics*. 1992;37(Suppl. 1):5-11.
61. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov 1;142(11):4891-9.

62. Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoef M, Paniel B, Prieur M, Zorn JR, Milgrom E. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Molecular Endocrinology*. 1999 Nov;13(11):1844-54.
63. Fauser BC, van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine reviews*. 1997 Feb 1;18(1):71-106.
64. de Wolff-Exalto EA. Influence of gonadotrophins on early follicle cell development and early oocyte growth in the immature rat. *Journal of reproduction and fertility*. 1982 Nov 1;66(2):537-42.
65. McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of reproduction*. 1997 Nov 1;57(5):990-8.
66. Halpin DM, Jones A, Fink G, Charlton HM. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic—pituitary ovarian axis. *Journal of reproduction and fertility*. 1986 May 1;77(1):287-96.
67. Van Cappellen WA, Meijs-Roelofs HM, Kramer P, Van den Dungen HM. Ovarian follicle dynamics in immature rats treated with a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist (Org. 30276). *Biology of reproduction*. 1989 Jun 1;40(6):1247-56.
68. Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1998 May 1;13(5):1133-8.
69. Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT. Evidence of a role for follicle-stimulating hormone in controlling the rate of preantral follicle development in sheep. *Endocrinology*. 2004 Apr 1;145(4):1870-9.
70. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human reproduction update*. 2016 Oct 20;22(6):709-24.
71. Weenen C, Laven JS, von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2004 Feb 1;10(2):77-83.
72. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Human reproduction*. 2006 May 23;21(9):2223-7.

73. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec 1;140(12):5789-96.
74. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov 1;142(11):4891-9.
75. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Jan 3;103(1):224-9.
76. Luo W, Wiltbank MC. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. *Biology of reproduction*. 2006 Aug 1;75(2):217-25.
77. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Molecular human reproduction*. 2013 Sep 10;19(12):828-37.
78. Sen A, Prizant H, Light A, Biswas A, Hayes E, Lee HJ, Barad D, Gleicher N, Hammes SR. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Feb 25;111(8):3008-13.
79. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov 1;142(11):4891-9.
80. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 Nov 1;89(11):5321-7.
81. Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin  $\beta$  subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertility and sterility*. 2009 Nov 30;92(5):1794-8.
82. Estienne A, Pierre A, Di Clemente N, Picard JY, Jarrier P, Mansanet C, Monniaux D, Fabre S. Anti-Müllerian hormone regulation by the bone morphogenetic proteins in the sheep ovary: deciphering a direct regulatory pathway. *Endocrinology*. 2015 Jan 1;156(1):301-13.
83. Kuroda T, Lee MM, Haqq CM, Powell DM, Manganaro TF, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-

- stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology*. 1990 Oct 1;127(4):1825-32.
84. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, Van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*. 1995 Nov 1;136(11):4951-62.
  85. Weintraub A, Margalioth EJ, Chetrit AB, Gal M, Goldberg D, Alerhand S, Eldar-Geva T. The dynamics of serum anti-Müllerian-hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH-antagonist short protocol in polycystic ovary syndrome and low responders. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2014 May 31;176:163-7.
  86. La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Human Reproduction*. 2004 Dec 1;19(12):2738-41.
  87. Catteau-Jonard S, Pigny P, Reyss AC, Decanter C, Poncelet E, Dewailly D. Changes in serum anti-müllerian hormone level during low-dose recombinant follicular-stimulating hormone therapy for anovulation in polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 Nov 1;92(11):4138-43.
  88. Al-Attar L, Noël K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *Journal of Clinical Investigation*. 1997 Sep 15;100(6):1335.
  89. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarrás P, Kumar TR, Dutertre M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R. Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Müllerian hormone (AMH) production through sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH Gene. *Molecular Endocrinology*. 2003 Apr 1;17(4):550-61.
  90. Thomas FH, Telfer EE, Fraser HM. Expression of anti-Müllerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*. 2007 May;148(5):2273-81.
  91. Anderson RA, Themmen AP, -Qahtani AA, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Human Reproduction*. 2006 Jul 4;21(10):2583-92.
  92. Hagen CP, Sørensen K, Anderson RA, Juul A. Serum levels of antimüllerian hormone in early maturing girls before, during, and after suppression with GnRH agonist. *Fertility and sterility*. 2012 Nov 30;98(5):1326-30.

93. Arbo E, Vetori DV, Jimenez MF, Freitas FM, Lemos N, Cunha-Filho JS. Serum anti-müllerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. *Human Reproduction*. 2007 Nov 2;22(12):3192-6.
94. Kallio S, Puurunen J, Ruukonen A, Vaskivuo T, Piltonen T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertility and sterility*. 2013 Apr 30;99(5):1305-10.
95. Königer A, Kauth A, Schmidt B, Schmidt M, Yerlikaya G, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Birdir C. Anti-Müllerian-hormone levels during pregnancy and postpartum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013 Jul 11;11(1):60.
96. Chan C, Liu K. Clinical pregnancy in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and low AMH: utility of ovarian reserve markers in IHH. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014 Oct 1;31(10):1317-21.
97. Gray SA, Mannan MA, O'Shaughnessy PJ. Development of cytochrome P450 aromatase mRNA levels and enzyme activity in ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. *Journal of molecular endocrinology*. 1995 Jun 1;14(3):295-301.
98. Mendelson CR, Kamat A. Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007 Sep 30;106(1):62-70.
99. Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH. Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and sterility*. 2009 Jul 31;92(1):217-21.
100. Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertility and sterility*. 2008 May 31;89(5):1364-70.
101. Nielsen ME, Rasmussen IA, Kristensen SG, Christensen ST, Mollgard K, Wreford Andersen E, Byskov AG, Yding Andersen C. In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Molecular human reproduction*. 2010 Sep 14;17(1):63-70.
102. Chang HM, Klausen C, Leung PC. Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertility and sterility*. 2013 Aug 31;100(2):585-92.



103. Sacchi S, Marinaro F, Giulini S, Argento C, Marsella T, Bastai F, Tagliasacchi D, Tirelli A, La Marca A. Effect of AMH on granulosa-lutein cells response to gonadotropins. *Hum Reprod*. 2014 Jul 1;29:321-.
104. Prapa E, Vasilaki A, Dafopoulos K, Katsiani E, Georgoulas P, Messini CI, Anifandis G, Messinis IE. Effect of Anti-Müllerian hormone (AMH) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) on steroidogenesis in primary-cultured human luteinizing granulosa cells through Smad5 signalling. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015 Jul 1;32(7):1079-88.
105. Hagen CP, Aksglaede L, Sorensen K, Mouritsen A, Andersson AM, Petersen JH, Main KM, Juul A. Individual serum levels of anti-Müllerian hormone in healthy girls persist through childhood and adolescence: a longitudinal cohort study. *Human Reproduction*. 2012 Jan 2;27(3):861-6.
106. Lashen H, Dunger DB, Ness A, Ong KK. Peripubertal changes in circulating antimüllerian hormone levels in girls. *Fertility and sterility*. 2013 Jun 30;99(7):2071-5.
107. Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Human reproduction*. 2010 Aug 20;25(10):2597-604.
108. Andersen CY, Lossl K. Increased intrafollicular androgen levels affect human granulosa cell secretion of anti-Müllerian hormone and inhibin-B. *Fertility and sterility*. 2008 Jun 30;89(6):1760-5.
109. Liberty G, Ben-Chetrit A, Margalioth EJ, Hyman JH, Galoyan N, Eldar-Geva T. Does estrogen directly modulate anti-müllerian hormone secretion in women?. *Fertility and sterility*. 2010 Nov 30;94(6):2253-6.
110. Gnoth C, Roos J, Broomhead D, Schiffner J, Godehardt E, Freundl G, Johnson S. Antimüllerian hormone levels and numbers and sizes of antral follicles in regularly menstruating women of reproductive age referenced to true ovulation day. *Fertility and sterility*. 2015 Dec 31;104(6):1535-43.
111. Guerrier D, Boussin L, Mader S, Josso N, Kahn A, Picard JY. Expression of the gene for anti-Müllerian hormone. *Journal of reproduction and fertility*. 1990 Mar 1;88(2):695-706.
112. Grynberg M, Pierre A, Rey R, Leclerc A, Arouche N, Hesters L, Catteau-Jonard S, Frydman R, Picard JY, Fanchin R, Veitia R. Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012 Sep 1;97(9):E1649-57.
113. Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptor- $\beta$  is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*. 2005 Aug 1;146(8):3247-62.

114. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 2002 Nov 1;124(5):601-9.
115. Visser JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2005 Apr 29;234(1):81-6.
116. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, Raine-Fenning N, Campbell BK, Yding Andersen C. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2013 Apr 4;19(8):519-27.
117. Chilvers RA, Bodenbun YH, Denner LA, Urban RJ. Development of a Novel Protocol for Isolation and Purification Of Human Granulosa Cells. *Fertility and Sterility*. 2011 Mar 15;95(4):S10.
118. Marchenko S, Flanagan L. Counting human neural stem cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2007 Aug 22(7):e262-.
119. Fang WL, Lai SY, Lai WA, Lee MT, Liao CF, Ke FC, Hwang JJ. CRTC2 and Nedd4 ligase involvement in FSH and TGF $\beta$ 1 upregulation of connexin43 gap junction. *Journal of molecular endocrinology*. 2015 Dec 1;55(3):263-75.
120. Ke FC, Fang SH, Lee MT, Sheu SY, Lai SY, Chen YJ, Huang FL, Wang PS, Stocco DM, Hwang JJ. Lindane, a gap junction blocker, suppresses FSH and transforming growth factor  $\beta$ 1-induced connexin43 gap junction formation and steroidogenesis in rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology*. 2005 Mar 1;184(3):555-66.

## 8. EKLER

### EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



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

Sayı : 16969557-32

#### ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 22.02.2016 PAZARTESİ  
**Toplantı No** : 2016/04  
**Proje No** : GO 16/43 (Değerlendirme Tarihi : 22.02.2016)  
**Karar No** : GO 16/43 – 25

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Lale KARAKOÇ SÖKMENSÜER'in sorumlu araştırmacı olduğu, Biyolog Hande YEĞENOĞLU, Doç. Dr. Gürkan BOZDAĞ, Dr. Sezcan MÜMÜŞOĞLU, Doç. Dr. Dilara ZEYBEK, Prof. Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU, Doç. Dr. Ebru BODUR ve Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN ile birlikte çalışacakları Vet. Hek. Ramin HASHEMİHESAR'ın tezi olan, GO 16/43 kayıt numaralı ve "Rekombinant FSH'nın IVF Tedavisi Uygulanan Polikistik Over Sendromlu Hastaların Follikül Sıvılarından Elde Edilen Granüloza Hücrelerinde Konneksin 43 ve Aromataz Aktivitesi Üzerine Etkisi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

#### KATILMADI

- |  |  |
|--|--|
| 1. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Başkan)     | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)      |
| 2. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Üye)             | 11. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)          |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)          | İZİNLİ<br>12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)  |
| İZİNLİ<br>4. Prof. Dr. Cenk SÖKMENSÜER (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)        |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)      | 14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)      |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)           | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)           | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)         |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)         | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)        |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)       | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                |

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

**Adı, Soyad:** Ramin HASHEMIHESAR  
**Doğum yeri ve tarihi:** İRAN-OROUMİEH, 21.09.1985  
**Uyruğu :** İRAN  
**İletişim Adresi:** Tınaztape Mahallesi, Libya Caddesi, 55/6 Çankaya, Ankara  
**Telefonu:** +905061616238

### II- Eğitim

**2011-2017** Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı  
**2003-2009** Azad İslami Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Yüksek  
Lisans Programı

### III- Mesleki Deneyim

### IV- Bilimsel Faaliyetler

#### Yayınlar (Makale ve kitaplar):

**2016** Histoloji Laboratuvar Yardımcı Kitabı, 4.Baskı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Copyright©, 2016 Hacettepe Üniversitesi. ISBN: 978-975-491-426-9 (Yardımcı yazar)

**2015** Histology Laboratory Guide Book Second Edition, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology, Copyright©,2015 by Hacettepe University ISBN: 978-975-491-413-9, Co-author

**2015** Toğral, Güray, M. Arıkan, Petek Korkusuz, Ramin Hashemi Hesar, and M. Fatih Ekşioğlu. "Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur." Eklem Hastalik Cerrahisi 26, no. 3 (2015): 137-144.

**2009** Hasar, Ramin Hashemi, and Alireza Najafpour. "Effects of ascorbic acid for premedication of cats following ketamine anaesthesia." J. Anim. Vet. Adv 8 (2009): 2096-2099.

#### **Poster ve Sözlü Sunumlar**

**2016** Ersoy Konaş, Haldun Kamburoğlu, Utku Özcan, Ramin Hashemihesar, Petek Korkusuz, 2016. Botulinum A toksininin yağ yamalarının yaşamsallığına etkisi. 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation, April 30- May 3, 2016, Volume 5 / 2016 Supplement. Page 612

**2016** The effects of the epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor loaded polycaprolactone (PCL) scaffold in repair of tendon defects. Gazi Huri, İsmail Aykut Koçyiğit, Sinan Yürüker, Can Ilgın, Ramin Hashemihesar, Egemen Turhan, Pınar Huri, Mahmut Nedim Doral. Acta Orthop Traumatol Turc ISSN 1017-995x. (Vol.) 50 Suppl. 1, October 2016, page 26.

**2015** Güray Toğral, Ş. Murat Arıkan, Petek Korkusuz, Ramin Hashemi Hesar, M. Fatih Ekşioğlu, 2015. Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur. EMK2015 Sabancı University Electron Microscopy Congress abstract book page 49

#### **Kongre, Sempozyum ve Eğitimler:**

**2016** Deney hayvanları kullanım sertifikası (27.07.2016)

**2016** THED XIII.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (30 Nisan-3 Mayıs 2016)

**2016** Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü (27 Kasım 2016)

**2015** TÜBA-Kök Hücre Tedavilerinde Güncel Yaklaşımlar Sempozyumu (20 Ekim 2015)

**2014** Biyoistatistiksel Çözümleme Kursu (27-30 Mayıs 2014)

- 2014** Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi (26-28 Eylül 2014)
- 2014** 1.Hacettepe Writing Workshop (1-2 Ekim 2014)
- 2014** Asistan etik eğitimi (30-31 Ekim 2014)
- 2014** Temel iş sağlığı ve güvenliği eğitimi (Aralık 2014)
- 2014** THED XII.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (27-30 Mayıs 2014)
- 2014** Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü (19 Kasım 2014)