

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**POLİKİSTİK OVER**  
**SENDROMUNUN PATOGENEZİNDE**  
**PROGRANULİN VE TNF-ALFA'NIN ROLÜ**

**Dr. Esmâ Andaç UZDOĞAN**  
**UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA**  
**2013**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**POLİKİSTİK OVER  
SENDROMUNUN PATOGENEZİNDE  
PROGRANULİN VE TNF-ALFA'NIN ROLÜ**

**Dr. Esmâ Andaç UZDOĞAN  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Filiz AKBIYIK**

**ANKARA  
2013**

## RAPOR

Dr. Esmâ Andaç Uzdoğan'ın 3 Haziran 2013 tarihinde jürimiz önünde savunmasını yaptığı "Polikistik Over Sendromunun Patogenezinde Progranulin ve TNF-alfa'nın Rolü" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

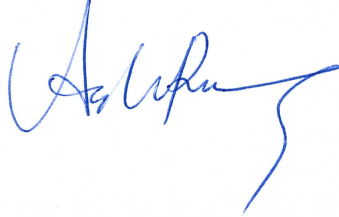
Prof. Dr. N. Leyla Açıan



Prof. Dr. Filiz Akbıyık



Doç. Dr. Aslı Pınar



### ONAY

**Bu tez, Tıp'ta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliđi ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.**

**Prof. Dr. Bülent Sivri**  
**Tıp Fakültesi Dekanı**

## TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmalık eğitimim süresince teşvik edici yaklaşımı, tez çalışmamın yazılmasında gösterdiği destek, tezimin tamamlanmasındaki bilgi ve deneyimleriyle yapmış olduğu katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Filiz Akbıyık'a teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. N. Leyla Açıan'a ve Anabilim Dalımızın tüm öğretim üye ve yardımcılarına gösterdikleri destek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aylın Pelin Çil'e ve Arş. Gör. Dr. Meryem Kuru Pekcan'a hastaların toplanmasındaki yardımları ve tez çalışmama katkıları nedeniyle teşekkür ederim. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Üçler Kısa'ya teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca bana verdikleri sevgi, emek, güven, destek ve anlayış için aileme sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

**Uzdoğan E.A. Polikistik over sendromunun patogenezinde progranulin ve TNF-alfa'nın rolü. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013.** Polikistik over sendromu (PKOS) menstruel düzensizlik, hirsutizm, akne ve obezite ile karakterize bir sendromdur. Kronik ve subklinik inflamasyon, insülin direnci PKOS'un temel patolojik mekanizmalarıdır. İnflamatuvar hücrelerden ve adipoz dokudan salgılanan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ )'nın inflamatuvar hastalıklar, obezite ve PKOS patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Adipoz dokudan salgılanan ve yeni bir adipositokin olarak tanımlanan progranulinin (PGRN) etkilerini TNF- $\alpha$  reseptörleri üzerinden meydana getirdiği ve bazı çalışmalarda anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir. PGRN 68-88 kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve otokrin büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir. Bu çalışmada PKOS patogenezinde TNF- $\alpha$  ve PGRN'in rolü ve bu moleküllerin birbiri ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca PKOS'lu hastaların total oksidatif kapasite (TOS), total anti-oksidan kapasite (TAOS), dehidroepiandrostenedion sülfat (DHEAS) ve paraoksonaz 1 (PON1) enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol grubu ile karşılaştırılması planlanmıştır. Bu amaçla 40 PKOS'lu hasta ve 40 sağlıklı kontrol grubunda serum PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçüldü. Serum PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PKOS'lu hasta grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ( $p=0,037$ ,  $p=0,041$ ). Ayrıca, her iki grupta PGRN ve TNF- $\alpha$  artışlarının paralellik gösterdiği bulundu. TOS düzeyinin kontrol grubunda TAOS düzeyinin ise PKOS'lu hasta grubunda daha yüksek olduğu ve DHEAS'ın TAOS düzeyine paralel olarak artış gösterdiği gözlemlendi. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) üzerinde yer alan PON1 aktivitesinin PKOS hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p=0,009$ ). TNF- $\alpha$  ve PGRN düzeylerinin PKOS'lu hastalarda daha yüksek olması, bu iki parametrenin paralel bir artış göstermesi ve aynı reseptörü kullanması nedeniyle aralarında reseptör düzeyinde kompetitif bir yarış olabileceğini düşündürmektedir. PKOS patogenezinde PGRN artışının, moleküler düzeyde TNF- $\alpha$ 'ya karşı koruyucu bir etkisinin olabileceği sonucuna varıldı. Destekleyen kuruluş HÜBAB 012D07101001

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik over sendromu, progranulin, TNF-alfa, oksidatif stres

## ABSTRACT

**Uzdoğan E.A., Role of progranulin and TNF- $\alpha$  in polycystic ovary syndrome pathogenesis. Hacettepe University Faculty of Medicine, Medical Biochemistry Thesis, Ankara, 2013.** Polycystic ovary syndrome (PCOS) is characterized by menstrual irregularities, hirsutism, acne and obesity. Chronic and subclinical inflammation, insulin resistance are the basic pathological mechanisms of PCOS. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) released from inflammatory cells and adipose tissue is known to play a role in the pathogenesis of inflammatory disease, insulin resistance and PCOS. According to the recent publications, progranulin (PGRN), which is released from adipose tissue, is suggested to use TNF- $\alpha$  receptors and has anti-inflammatory effects. PGRN is a 68-88 kDa glycoprotein and a member of the groups of autocrine growth factors. In this study, we aimed to investigate the role of PGRN and TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of PCOS and the interaction of the molecules with each other. Additionally, we planned to measure total oxidant status (TOS), total anti-oxidant status (TAOS), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) and paraoxonase 1 (PON1) enzyme activities in PCOS patients and compare to the control group. For this purpose, PGRN and TNF- $\alpha$  serum levels were measured in 40 PCOS patient and 40 healthy control group. Serum PGRN and TNF- $\alpha$  were significantly higher in patients with PCOS compared with the control group ( $p=0.037$ ,  $p=0.041$ ). In addition, both groups were shown to correlate with increases in PGRN and TNF- $\alpha$ . TOS level was higher in control group, TAOS level was higher in the PCOS patient group and DHEAS level increased with TAOS level in a parallel manner. PON1 activity, found on the high density lipoprotein (HDL), was higher in PCOS patients than the control group and the difference was statistically significant (0.009). The parallel increase of PGRN and TNF- $\alpha$  serum levels in the PCOS patients and the fact that they are using the same receptor suggest that there is a competition between PGRN and TNF- $\alpha$  at the receptor level. The increase in PGRN may have a protective effect against TNF- $\alpha$  at the molecular level in the pathogenesis of PCOS. Supported by HÜBAB 012D07101001

**Key Words:** Polycystic ovary syndrome, progranulin, TNF- $\alpha$ , oxidative stress

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xi</b>
<b>TABLolar</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Polikistik Over Sendromu	3
2.2. PKOS Etiyopatogenezi	4
2.3. TNF- $\alpha$ Yapısı ve Etki Mekanizması	6
2.4. PGRN ve İnflamasyon, TNF- $\alpha$ ile İlişkisi	9
2.5. PGRN ve İnsulin Direnci	13
2.6. PKOS ve Oksidatif Stres	14
2.7. Paraoksonaz	15
<b>3. GEREÇLER VE YÖNTEM</b>	<b>17</b>
3.1. Gereçler	17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler	17
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	17
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	17
3.2.1. Hasta Grubunun Oluşturulması	18
3.2.2. Kontrol Grubunun Oluşturulması	18
3.3. Klinik Değerlendirme	18
3.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Serumların Ayrılması	19
3.5. Yöntemler	19
3.5.1. VKİ Hesaplanması	19
3.5.2. İnsulin Direnci Hesaplanması	19
3.5.3. Serbest Androjen İndeksi (FAI) Hesaplanması	19



3.5.4. Klinik Biyokimya ve Hormon Testleri	20
3.5.5. TNF- $\alpha$ Düzeyi Ölçümü	20
3.5.6. PGRN Düzeyi Ölçümü	20
3.5.7. TOS Düzeyi Ölçümü	20
3.5.8. TAOS Düzeyi Ölçümü	21
3.5.9. PON1 Aktivite Ölçümü	21
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	22
<b>4. BULGULAR</b>	<b>23</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>32</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>37</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>38</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

17AOHP	17- $\alpha$ Hidroksi Progesteron
ABTS	2,2'-Azinobis (3 Etilbenzotiyazolin-6-Sülfonik Asit)
AKŞ	Açlık kan şekeri
ApoA1	Apoliprotein A1
ApoE	Apolipoprotein E
ARE	Arilesteraz
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
CAT	Katalaz
CRDs	Sisteinden Zengin Tekrarlayan Altbirimler
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoik Asit)
DHEAS	Dehidrepiandrostenedionsülfat
E2	Östrodiol
ELISA	Enzim Bağlı İmmunassay
FAI	Serbest Androjen İndeksi
FGS	Ferriman Gallwey Skoru
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GEP	Granulin Epitelin Öncüsü
GLUT-4	Glukoz Taşıyıcı Tip-4
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GRN	Granulin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HOMA-IR	Homeostatik Model İle İnsulin Direnci Değerlendirmesi
HTLaz	Homosistein Tiyolaktonaz
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IR	İnsülin Reseptörü
IRS-1/2	İnsülin Reseptör Substratı-1/2
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit

LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LH	Luteinizan Hormon
mTNF	Monomer Tümör Nekrozis Faktör
NAD(P)H	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (Fosfat)
NE	Nötrofil Elastaz
NET	Nötrofil Ekstraselüler Tuzak
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NSP	Nötrofil Serin Proteazlar
PGRN	Progranulin
PKOS	Polikistik Over Sendromu
PLAD	Preligand Association Altbirimi
PON1	Paraoksonaz 1
PPAR- $\gamma$	Peroksizom Proliferatörleri İle Aktive Olan Reseptörler- $\gamma$
PR3	Proteinaz 3
PRL	Prolaktin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
sT	Serbest Testosteron
SHBG	Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SOD	Süperoksit Dismutaz
SLPI	Sekretuar Lökosit Proteinaz İnhibitör
sTNF	Soluble Tümör Nekrozis Faktör
T	Testosteron
T2DM	Tip 2 Diyabetes Mellitus
TAOS	Total Anti-Oksidan Kapasite
TACE	Tümör Nekrozis Faktör Dönüştürücü Enzim
TG	Trigliserid
TK	Total Kolesterol
TMB	Tetrametil Benzidin
TNB	2-nitro-5-tiyobenzoik asit

TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör - $\alpha$
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TNFR1	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 1
TNFR2	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 2
TOS	Total Oksidatif Kapasite
Tris-HCl	Tris (Hidroksimetil) Aminometan Hidroklorid
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
tT	Total Testosteron
VKİ	Vücut kitle indeksi

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Adipoz dokudan salgılanan adipositokinlerin ve inflamatuvar belirteçlerin etkileri	6
2.2. TNFR yapısı ve ligand bağlanma bölgeleri	8
2.3. İnsülin reseptörünün yapısı	9
2.4. İnsan GRN'lerinin kristalografik yapısı	11
4.1. PKOS'lu hasta ve kontrol gruplarının PGRN düzeyleri	27
4.2. PKOS'lu hasta ve kontrol gruplarının TNF- $\alpha$ düzeyleri	28
4.3. Kontrol grubunda PGRN ve TNF- $\alpha$ arasındaki korelasyon	29
4.4. PKOS'lu hasta grubunda PGRN ve TNF- $\alpha$ arasındaki korelasyon	29
4.5. PKOS'lu hasta grubunda DHEAS ve TAOS arasındaki korelasyon	31

**TABLÖLAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
4.1. Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunun tanımlayıcı özellikleri	24
4.2. Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunun hormonal açıdan değerlendirilmesi	25
4.3. Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunun biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi	26

## GİRİŞ VE AMAÇ

Polikistik Over Sendromu (PKOS), menstrüel düzensizlik, hirsütizm, akne ve obezite ile seyreden ve üreme dönemindeki kadınlarda en sık görülen endokrinolojik bozukluktur. PKOS'lu kadınlarda glukoz intoleransı ile beraber uzun dönemde metabolik sendromun komponentleri olan obezite, hiperlipidemi, tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), hipertansiyon, koroner ateroskleroz v.s. görülebilmektedir.

PKOS'un gelişiminde çok sayıda faktörün rol oynadığı bilinmekle beraber patogenezindeki moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. İnsulin sekresyon bozukluğu, insulin direnci, nöroendokrin bozukluklar ile luteinizan hormon (LH) salınımında artış; overlerde kortizol metabolizmasında görülen değişiklikler ve androjen sentezinde artış PKOS patogenezinde rol oynayabilmektedir. İnsulin ve androjen artışı overlerde parakrin sinyal iletimini bozarak folliküllerin büyümesini geciktirmektedir. Overlerin çevresinde biriken küçük antral folliküller polikistik görünümü meydana getirmektedir. PKOS gelişiminden sorumlu çok sayıda etkenin olması ve nedenlerinin sürekli bir döngü içerisinde yer alması patogenezinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. PKOS patogenezinde overlerdeki bozukluğun yanında adipoz dokuda meydana gelen hipertrofinin ve obezitenin de rol oynadığı bilinmektedir. Adipoz doku artışı çeşitli adipositokin ve inflamatuvar belirteçlerin salınımına neden olmaktadır. PKOS'lu hastalarda uzun dönemde ortaya çıkan insülin direnci, obezite, T2DM, kardiyovasküler hastalıklar gibi morbidite ve mortalitesi yüksek hastalıklardan adipositokinler sorumlu tutulmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla artık en büyük endokrin organın adipoz doku olduğu sonucuna varılmıştır. Adipoz dokudan salınan besin alımı ve enerji kullanımı arasındaki dengeyi sağlayan, obezite, inflamasyon ve çeşitli metabolik olaylarda rolü olan leptin, adiponektin, rezistin, visfatin, tümör nekrosis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6) gibi çok sayıda molekül tanımlanmıştır. Progranulin (PGRN), anti-inflamatuvar fonksiyonu gösterilmiş en son tanımlanan adipositokinlerden biridir. PGRN aynı zamanda 593 aminoasit içeren glikoprotein yapıda otokrin bir büyüme faktörüdür. Adipoz doku dışında epitel hücreleri, lökositler, nöronlar ve kondrositler tarafından salgılandığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda PGRN'in etkilerini tümör nekrosis faktör- $\alpha$  reseptörleri (TNFR)

üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir. PKOS'lu hastalarda patogeneze sorumlu tutulan insülin direnci ve obezitenin temelinde kronik, subklinik bir inflamasyonun olduğu ve inflamatuvar hücrelerden TNF- $\alpha$  salınımının gerçekleştiği bilinmektedir. PGRN'in anti-inflamatuvar etkileri ve TNFR'lerini uyararak çalıştığı göz önüne alındığında PKOS patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda PKOS'lu hastalarda ayrıca oksidatif stresin obezite, T2DM ve kronik hastalıkların gelişmesinde rol oynadığı bildirilmektedir. Total oksidatif kapasite (TOS) hücrenin oksidatif hasara yatkınlığını gösteren ve *in vitro* ölçümleri yapılabilen bir parametredir. Hücrenin oksidatif hasara karşı korunmasını sağlayan anti-oksidan moleküller ise total anti-oksidan kapasite (TAOS) olarak ölçülebilmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı lipoprotein (HDL) yapısında yer alan paraoksonaz 1 (PON1) anti-oksidan etkisiyle ateroskleroz gelişimini önlemektedir. PON1 aktivitesi fenilasetat ve homosistein tiyolakton substratları kullanılarak tayin edilebilmektedir.

Bu çalışmada adipoz dokudan salgılanan TNF- $\alpha$  ve PGRN düzeylerinin PKOS'lu hastalarda ve kontrol grubunda ölçümlerinin yapılarak karşılaştırılması ve bu adipositokinlerin PKOS patogenezindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca hasta serumlarında TOS ve TAOS düzeylerinin ölçümü, PON1 enzim aktivite tayininin yapılması ve tüm parametrelerin kontrol grubu ile karşılaştırılması planlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Polikistik Over Sendromu

PKOS, doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık (% 9-10) görülen endokrin bozukluktur (1-4). İlk olarak Stein ve Leventhal tarafından 1935 yılında tanımlanmıştır. Günümüzde görülme sıklığı sürekli artmakta olan bir sendromdur. Buna göre PKOS tanısı için klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ile kronik anovülasyon bulunması ve benzeri kliniğe yol açabilecek diğer nedenlerin elimine edilmesi gerekmektedir.

PKOS'lu hastalarda klinik olarak menstrüel düzensizlik, hirsütizm, akne, alopesi ve tekrarlayan abortuslar görülebilir. Ayrıca endokrinolojik olarak androjen, LH, östrojen ve prolaktin (PRL) düzeyleri yüksek bulunabilir. PKOS, metabolik olarak genellikle insülin direnci, T2DM, dislipidemi, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, psikiyatrik, nörolojik bozukluklar ve jinekolojik kanserlerle ilişkili olan bir sendromdur (2-6).

Polikistik over sendromunun belirti ve bulguları; hirsütizm (% 60-90), oligomenore (% 50-90), infertilite (% 55-75), polikistik over (% 50-75), obezite (% 40-60), amenore (% 25-50), akne (% 25), disfonksiyonel uterus kanaması (% 30) şeklinde tanımlanmıştır.

PKOS tanısı için çeşitli kriterler kullanılmaktadır. NIH kriterleri gözden geçirilerek 2003 yılında Rotterdam kriterleri oluşturulmuştur.

A- 1990 NIH tanı kriterleri

1. Kronik anovülasyon ve
2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve diğer etyolojik nedenlerin ekarte edilmesi

B- 2003 Rotterdam yeniden gözden geçirilmiş tanı kriterleri: Üç kriterden ikisinin bulunması gerekmektedir.

1. Oligo-anovülasyon
2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
3. Polikistik overler ve diğer etyolojik nedenlerin ekarte edilmesi

PKOS tanısı kliniklerde Rotterdam kriterlerine göre yapılmaktadır.

## 2.2. PKOS Etyopatogenezi

Etyoloji kesin olarak bilinmemekle birlikte PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Sendromun fizyopatolojisinde gonadotropin dinamiğinde değişiklikler, steroidogenez defektleri, insülin salgılanma ve etki bozuklukları beraberinde genetik faktörler ön plana çıkmaktadır.

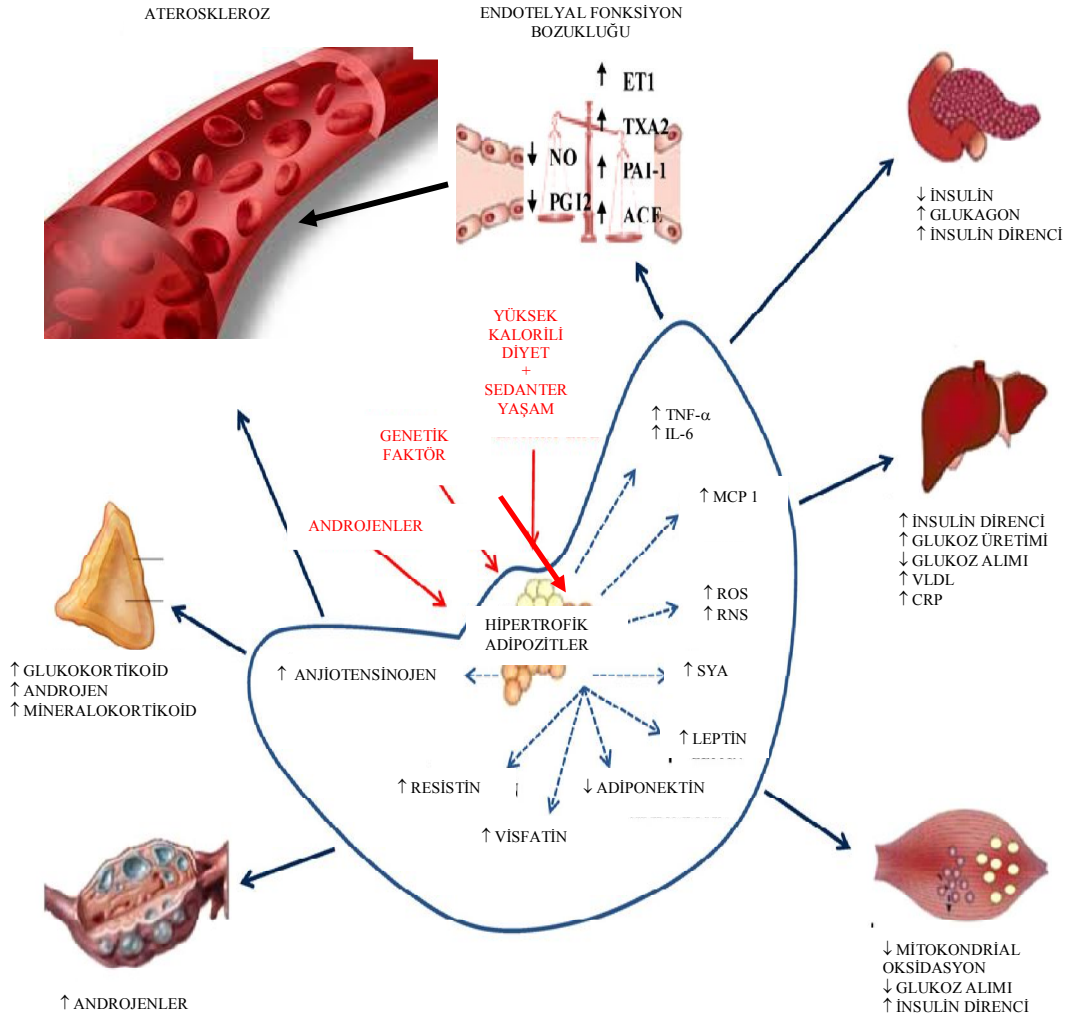
PKOS patogenezinde hipotalamo-hipofizer aksındaki bozukluk hiperandrojenemi bulgularını açıklamaktadır. PKOS'lu hastalarda hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) pulsasyonunda artış gözlenmektedir. Bunun sonucunda hipofizden LH salgılanması daha sık ve yüksek düzeylerde olmaktadır. LH salgılanmasındaki artış sonucunda teka hücrelerinde androjen sentezi artmaktadır. Fizyolojik olarak aktif olan androjenler 17-alfa-hidroksiprogesteron (17-AOHP), androstenedion ve testosteron (T) olarak sıralanabilmektedir. Dokularda serbest testosteron (sT) formunda fizyolojik etkinlik gösteren T'nin kanda taşınmasını seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) sağlamaktadır. T'nin SHBG ile bağlı formu ve sT düzeyi toplamı total T (tT)'yi oluşturmaktadır. Hiperandrojenizm nedeniyle SHBG sentezinde azalma meydana gelmekte ve sT düzeylerinde artış gözlenmektedir. Böylece hiperandrojenizm bulguları daha şiddetlenmektedir (5).

PKOS patogenezinde androjen artışının inflamasyona neden olduğu belirtilmektedir. Ancak yapılan diğer çalışmalarda ise inflamatuvar moleküllerin androjen sentezini artırdığına dair bulgular yer almaktadır (7). Yapılan araştırmalarda androjenin, insulin sinyal iletiminde değişikliklere neden olarak adipozitlerde karbohidrat ve lipit metabolizmasında etkin enzimlerin sentezinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca androjenlerin adipoz dokunun immun fonksiyonlarında değişikliklere ve preadipozitlerin adipozitlere dönüşümünde rol oynadıkları bildirilmiştir (8). PKOS'ta meydana gelen androjen artışının adipoz doku mononükleer hücrelerinde glukozu duyarlılığı artırdığı ayrıca glukozun da adipoz dokuda mononükleer hücrelerin aktive olmalarına neden olduğu gösterilmiştir (8, 9). Mononükleer hücrelerin dönüşümü ile oluşan makrofajlardan TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılandığı gözlenmiştir (8, 9). Makrofajlar dışında adipoz

dokudan da salgılanan TNF- $\alpha$ 'nın, teka hücrelerinde proliferasyon meydana getirdiği ve steroid sentezini de artırdığı bildirilmiştir (8, 9).

PKOS etiopatogenezinde adipoz doku hipertrofisine bağlı insülin direnci gelişimi ve obezitenin rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir. Ancak obez olmayan (lean) PKOS'lu hasta oranının % 40-60 oranında olduğu bilinmektedir (5).

PKOS'lu hastaların etiopatogenezinde androjen artışı dışında genetik faktörler ve yüksek kalorili diyet, sedanter yaşam, adiposit hipertrofisi obezite, adipositokin salınımındaki artış gibi çevresel etmenlerin de rol oynadığı gösterilmiştir (10, 11). TNF- $\alpha$  dışında adipoz dokudan salgılanan birçok molekül inflamasyon ve insülin direnci gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bu hastalarda adipositokinlerden visfatin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeyinin artmış (12), serum adiponektin düzeyinin azalmış, leptin düzeyinin ise artmış olduğu gösterilmiştir (13). PKOS'lu hastalarda adipositokinlerin insülin direnci, T2DM, obezite, ateroskleroz gibi metabolik sendrom komponentlerinin oluşumunda rol oynadıkları bilinmektedir (7, 8) Şekil 2.1'de PKOS'lu hastalarda adipositokinler ve inflamatuvar belirteçlerin düzeylerindeki değişim ve etkileri gösterilmektedir. Başka bir çalışmada Xiong ve arkadaşları PKOS'lu hastalarda adipositokin ve inflamatuvar belirteçlerin değişimine ek olarak over dokusunda inflamasyon oluştuğunu immunohistokimyasal olarak göstermişlerdir (14). Bu çalışmada, normal vücut kitle indeksine (VKİ) sahip PKOS'lu hastaların over dokularında çok sayıda inflamatuvar hücre bulunduğu ve kronik inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hastaların serum örneklerinde TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi inflamasyon belirteçlerinin, VKİ'si normal olan kontrol grubuna göre çok yüksek olduğu belirtilmiştir (14).



Şekil 2.1 Adipoz dokudan salgılanan adipositokinlerin ve inflamatuvar belirteçlerin etkileri (7)

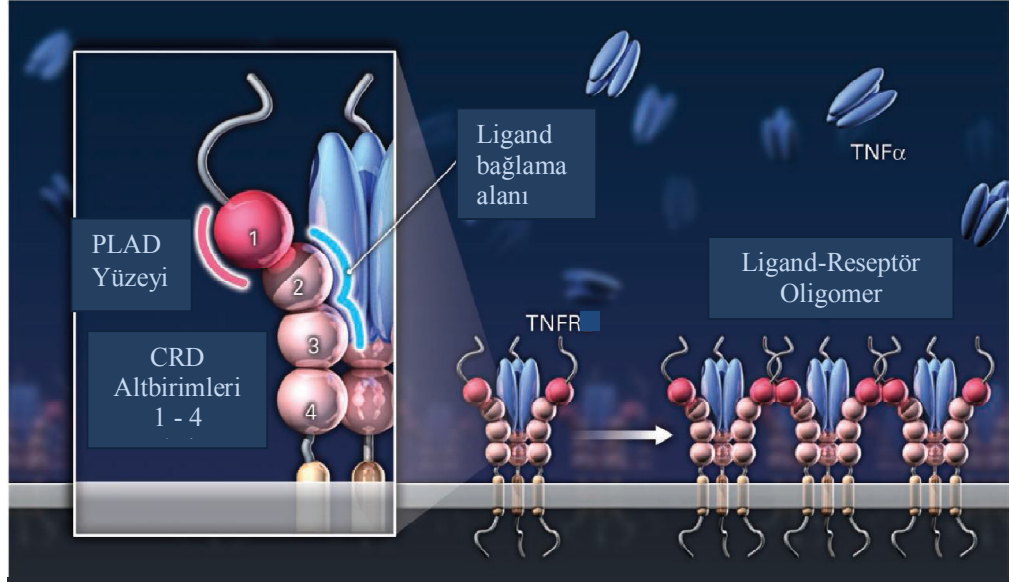
Son yıllarda PKOS patogenezi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, halen moleküler düzeyde belirsizlikler ve yanıtlanması gereken sorular bulunmaktadır.

### 2.3.TNF- $\alpha$ Yapısı ve Etki Mekanizmaları

TNF- $\alpha$  ilk olarak 1984 yılında aktive makrofajlardan izole edilmiş bir sitokindir. Daha sonra yapılan çalışmalarda endotel hücrelerinden, adipoz dokudan, aktive lenfositlerden ve inflamatuvar hücrelerden salgılandığı, çeşitli hücrel ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde görev aldığı bulunmuştur (15, 16). TNF- $\alpha$

biyolojik aktivitesini, transmembran monomer tümör nekrozis alfa (mTNF- $\alpha$ ) (26 kDa) ve soluble tümör nekrozis alfa (sTNF- $\alpha$ ) (17kDa) formlarında göstermektedir. mTNF- $\alpha$ , hücre yüzeyindeki tümör nekrozis alfa dönüştürücü enzim (TACE) ile proteolitik olarak sTNF- $\alpha$  molekülüne dönüştürülmektedir (17, 18). Hem mTNF- $\alpha$  hem de sTNF- $\alpha$  septik şok, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar ve insülin direnci gibi inflamatuvar bozuklukların patogeneğinde rol almaktadırlar. Ayrıca hücre farklılaşması ve proliferasyonu, apoptozis, nekrotik hücre ölümü, tümör oluşumu, viral replikasyon, enerji metabolizması ve immün sistem fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi çok farklı süreçlerde görev almaktadır (15, 16, 19).

TNF- $\alpha$  etkisini, tümör nekrozis faktör alfa reseptörleri 1 ve 2 (TNFR1 ve TNFR2) aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler glikoprotein yapıdadır ve transmembran olarak yerleşim göstermektedirler (Şekil 2.2). TNFR'leri, Fas, CD40, TRAIL reseptörlerini de içeren bir reseptör ailesinin üyesidir. Bu reseptör ailesinde hücre dışı bölümleri homoloji gösterirken hücre içi kısımlarda farklı yapılar bulunmaktadır. (19). TNFR1 (60 kDa) ve TNFR2 (80 kDa)'nin ligand bağlayan hücre dışındaki bölümleri %28 oranında homoloji göstermekte ancak hücre içindeki bölümde homoloji bulunmamaktadır (16, 19). TNFR'lerin hücre dışındaki bölümleri sistein aminoasidinden zengin tekrarlayan alt birimlerden (CRDs) oluşmaktadır. Bu alt birimler CRD1, 2, 3 ve 4 olarak isimlendirilmektedir. CRD1, TNFR'nin birbirine bağlanmasını sağlayan, 'preligand association domain' (PLAD) adı verilen ve ligand-reseptör ilişkisini güçlendiren yapısını oluşturmaktadır (Şekil 2.2) TNF- $\alpha$ , TNFR'nin ligand bağlayan CRD2 ve CRD3 alt birimine bağlanmaktadır. Daha sonra oluşan PLAD'lar birbirlerine bağlanarak reseptör zincirleri arasında etkileşime neden olmakta böylece ligand reseptör ilişkisi kuvvetlenmektedir (20, 21). TNFR1'in tüm hücre tiplerinde TNFR2'nin ise oligodendrosit, astrosit, T hücreleri, miyosit, timus hücreleri, endotelial hücreler ve insan mezenkimal kök hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (22).

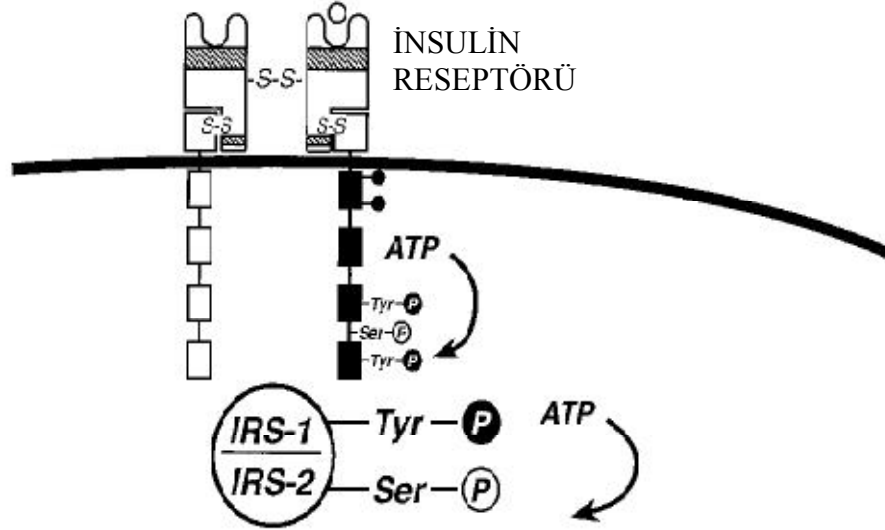


Şekil 2.2. TNFR yapısı ve ligand bağlanma bölgeleri (21)

TNF- $\alpha$ 'nın adipoz doku farklılaşması ve insulin direnci ile ilişkili bir adipositokin olduğu bilinmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın adipoz dokuya yağ asitlerinin alınmasını sağladığı ve lipogenez ile ilgili enzim genlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu enzimler; asetil koA karboksilaz, lipoprotein lipaz ve gliserofosfat dehidrogenaz olarak tanımlanmıştır. Ayrıca adipozitlerin olgun adipozitlere dönüşümünü sağlayan aP2, adipsin gibi genleri de inhibe ettiği gösterilmiştir (23, 24).

İnsülin, etkilerini intrinsek tirozin-kinaz aktivitesi bulunan insülin reseptörüne (IR) bağlanarak göstermektedir. İnsülin, reseptörüne bağlandığı zaman tirozin-kinaz aktivitesi ile reseptör otofosforile olmakta ve hücre içerisinde insülinin metabolik etkilerini göstermesini sağlayan insülin reseptör substratı-1/2 (IRS-1/2)'in fosforilasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.3). Böylece insülinin protein, lipid ve glikojen sentezi, glukozun dokulara alınımı gibi tüm metabolik etkileri ortaya çıkmaktadır. TNF- $\alpha$  ise insulin sinyal iletiminde postreseptör düzeyde IRS-1/2'nin fosforilasyonunu değiştirmektedir. İnsulin sinyal iletimi, tirozin-kinazın IRS1/2'yi tirozin aminoasidi üzerinden fosforile etmesiyle devam etmektedir (1, 25). TNF- $\alpha$ , IRS1/2'nin tirozin aminoasidi üzerinden değil serin aminoasidi üzerinden fosforilleyerek insulin sinyal iletim bozukluğuna ve insulin direncine neden

olmaktadır. TNF- $\alpha$  etkisiyle özellikle glukoz taşıyıcı tip-4 (GLUT-4) ekspresyonunun azaldığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (24, 26, 27). Şekil 2.3.'te IR'nin yapısı ve fosforilasyon bölgeleri gösterilmektedir.



Şekil 2.3. İnsulin reseptörünün yapısı (1)

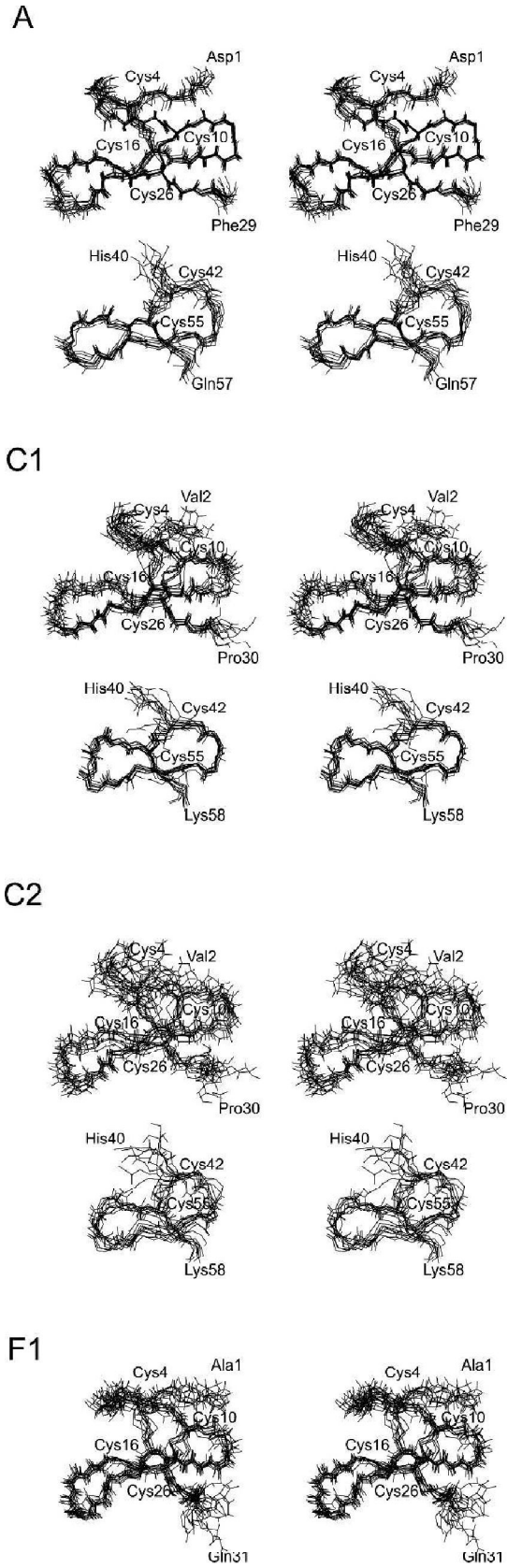
TNF- $\alpha$ , aynı zamanda peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör gama (PPAR- $\gamma$ ) aracılığıyla adipositler üzerinde etkilerini göstermektedir. PPAR- $\gamma$ , adipositlerde insülin ve glukoz metabolizması açısından kilit rolü bulunan bir moleküldür. Adipoz dokudan salınan TNF- $\alpha$  transkripsiyonel olarak PPAR- $\gamma$  mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca PPAR- $\gamma$ 'nın N-terminalinde bulunan serin aminoasidini fosforilleyerek PPAR- $\gamma$ 'nın etkilerini inhibe etmektedir (28-30). TNF- $\alpha$ 'nın tüm bu etkileri göz önünde bulundurulduğunda, PKOS'da meydana gelen inflamasyon ve insülin direncinden sorumlu olduğu anlaşılmaktadır.

#### 2.4. PGRN ve İnflamasyon, TNF- $\alpha$ ile İlişkisi

PGRN, 68-88 kDa ağırlığında ve 593 aminoasitten oluşan glikoprotein yapıda bir otokrin büyüme faktörüdür (31-33). PGRN; granulin epitelin öncüsü (GEP), PC hücre büyüme faktörü, proepitelin, akrogranin veya GP88 gibi farklı isimlerle adlandırılmaktadır (31-36). 17. Kromozomda 12 ekson ile kodlanmaktadır (31-33). PGRN proteazlar tarafından parçalanarak küçük homolog alt ünitelere ayrılabilir bu alt ünitelerin her biri granulinler (GRN) veya epitelinler olarak adlandırılır. Çok

sayıda sistein aminoasidinden oluşan GRN'lerin etkileri PGRN'den farklı hatta zıt yönde olabilmektedir. Şekil 2.4'te PGRN'yi oluşturan GRN'lerin NMR spektrofotometresi ile oluşturulan kristalografik yapısı görölmektedir (A, C1, C2, F1).





Şekil 2.4. İnsan GRN'lerinin kristalografik yapısı (PGRN'yi oluşturan GRN A, C1, C2, F1 altbirimlerini göstermektedir) (37)

PGRN'in, adiposit ve inflamatuvar hücreler dışında hızlı bölünen epitel hücreleri, lökositler, nöronlar ve kondrositlerden de izole edildiği gösterilmiştir (21, 32). Bazı çalışmalarda PGRN'in meme kanseri hücrelerini apoptozisten koruduğu, invazyon ve metastazı kolaylaştırdığı, kemoterapötik ilaçlara karşı dirence neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca over ve multiple myelom gibi bazı kanser türlerinde tümör gelişimini hızlandırdığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Bundan başka epitelizasyon ve yara iyileşmesini hızlandırdığı, kıkırdak doku gelişimini sağladığı ve erken embriyogenezde rol oynadığı rapor edilmiştir (21, 31, 32, 38-45). PGRN genindeki mutasyonlar nedeniyle frontotemporal demans ve nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıktığı anlaşılmıştır (46). Son yıllarda kronik inflamasyon, obezite, T2DM ve kardiyovasküler hastalıklarda yeni bir belirteç olabileceği bildirilmektedir (33, 47).

PGRN'in inflamatuvar süreçteki etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır ve literatürde konuyla ilgili olarak çelişkili bilgiler yer almaktadır. Bazı çalışmalarda PRGN salınımının kronik inflamasyona cevap olarak arttığı ve anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir (21, 33, 36). Daha sonra yapılan *in vivo* çalışmalarda ise PGRN'in parçalanma ürünleri olan GRN'lerin akut inflamasyonu şiddetlendirdiği ve PGRN ile bu inflamasyonun giderildiği rapor edilmiştir (35).

PGRN, TNFR'nin sistein aminoasidinden zengin CRD2 ve CRD3 altbirimine bağlanarak TNF- $\alpha$  ile TNFR arasında oluşan etkileşimi inhibe ettiği bildirilmiştir. PGRN geni olmayan farelerin kollajenle indüklenen artritlere daha duyarlı oldukları ve gelişen artrit PGRN tedavisine olumlu cevap verdiği çalışmalarla gösterilmiştir (35). TNF $\alpha$ -TNFR etkileşiminin bozulması, TNF- $\alpha$ 'nın neden olduğu inflamatuvar etkileri azaltmaktadır (21, 36). Üç GRN alt biriminin biraraya gelmesiyle sentetik olarak üretilen ve 'Atsttrin' adı verilen molekülün TNFR'ye bağlanmada TNF- $\alpha$  ile yarıştığı ve TNF $\alpha$ -TNFR etkileşimini bozduğu gösterilmiştir. Atsttrin'in anti-inflamatuvar etkisi bu şekilde ortaya çıkmaktadır (21). Hem PGRN hem de Atsttrin ile romatoid artritli fare modellerinde inflamasyonun önlendiği ancak Atsttrin'in anti-inflamatuvar etkilerinin daha güçlü olduğu bildirilmiştir (35). Ayrıca Atsttrin, PGRN'nin tümör gelişimindeki indükleyici etkilerini meydana getirmemektedir. Bu

özellikleriyle Atsttrin otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde hedef molekül olmaya adaydır.

Son yıllarda PGRN'nin anti-inflamatuvar etkisinden sorumlu başka bir mekanizma daha öne sürülmüştür. Proinflamatuvar bir uyarı olduğunda nötrofiller aktive olarak azurofilik granüllerde depolanan nötrofil Ser proteazların (NSP) hücre dışına çıkmasına veya nötrofil ekstraselüler tuzak (NET) oluşumuna neden olmaktadır. Proteaz 3 (PR3) bir NSP türüdür ve ekstraselüler ortamda nötrofillerden ve endotel hücrelerinden interlökin-8 (IL-8) salınımını sağlayarak kemotaksisi artırmaktadır. Aynı zamanda PR3 endotel hücre membranına bağlı olan TNF- $\alpha$ 'yı aktifleştirmektedir. Bu olay inflamasyon için en kritik basamağı oluşturmaktadır. Nötrofillerin damar dışına çıkması anti-inflamatuvar olan PGRN ile kontrol edilmektedir. PR3 ve nötrofil elastaz (NE) birlikte PGRN'yi degrade ederek inflamatuvar özelliğe sahip GRN'leri oluşturmaktadır (48, 49). PGRN'nin GRN'ye parçalanmasını engelleyen bazı enzimler bulunmaktadır. Sekretuar lökosit proteinaz inhibitör (SLPI), inflamasyon durumunda PGRN'ye bağlanarak nötrofillerden salgılanan NE ve PR3 enzimleri tarafından yıkılmasını engeller ve TNF- $\alpha$ 'nın etkilerini bloke eder. SLPI miktarındaki azalma PGRN'nin, PR3 ve NE tarafından GRN'lere parçalanmasına yol açar ve inflamasyon gelişimini tetikler (47). PGRN'nin GRN'e dönüşümünü engelleyen diğer bir çalışma PGRN'nin HDL yapısında bulunan apolipoprotein-A1 (ApoA1) ile kompleks oluşturmasıyla açıklanmaktadır. Ateroskleroz gelişiminde inflamatuvar etki gösteren GRN'lerin oluşumunun PGRN-ApoA1 kompleks oluşumu ile engellendiği bildirilmiştir (50).

## **2.5. PGRN ve İnsülin Direnci**

Son yıllarda yapılan araştırmalarda adipoz dokunun; metabolik fonksiyonları, iştahı, nöral aktiviteyi, sindirim fonksiyonunu düzenleyen ve inflamasyon oluşumuna aracılık eden birçok hormon salgıladığı belirlenmiştir (5). PGRN'nin inflamatuvar hücreler dışında adipoz dokuda da izole edilmesi bir adipositokin olarak araştırılmasına neden olmuştur. PGRN'in obezite ve insülin direnci ile ilişkisi birçok çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmalarda PGRN'nin serum düzeyi ile insülin direnci arasında paralel bir ilişki olduğu gösterilmiştir (33, 51, 52). Matsubara ve ark. (52) yaptığı bir çalışmada PGRN'in yağ dokusunda IL-6 sentezini ve insülin direncini

artırdığı belirtilmiştir. PGRN'in insülin direnci ile ilişkisini inceleyen bir diğer çalışmada ise serum örneklerinde PGRN düzeylerinin, T2DM'li hastalarda normal glukoz toleransına sahip gruba göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (33). Ancak bu çalışmalarda PGRN'in insülin direncine neden olduğu ya da insülin direncine cevap olarak artıp artmadığı net değildir.

## 2.6. PKOS ve Oksidatif Stres

Normal hücrel metabolizmada reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksitten meydana gelen reaktif nitrojen türleri (RNS) bulunmaktadır. Literatürde ROS ve TOS eşanlamlı olarak kullanılabilir. ROS'lar moleküler oksijen türevlerinden oluşur ve oksijen iyonları, serbest radikaller ve peroksitleri içermektedir (53). Ayrıca RNS ve ROS'lar sırasıyla nitrik oksit sentaz (NOS) ve nikotinamid adenin dinükleotid (fosfat) (NAD(P)H) oksidaz türevleri tarafından oluşturulmaktadır (54). ROS ve RNS'ler yaşayan sistemler için hem yararlı hem de zararlı etkileri bulunan moleküllerdir (55). Düşük ve orta seviyedeki ROS ve RNS'ler, enfeksiyonlara karşı savunmada ve birçok hücrel sinyal iletiminde farklı fizyolojik görevler üstlenmektedirler. Fakat yüksek oksidan konsantrasyonlarında DNA hasarı meydana geldiği veya hücrel lipid ve proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulduğu bilinmektedir (54).

TOS deneysel olarak çeşitli yöntemlerle saptanmaktadır. Örnekte bulunan total peroksit düzeyi, 3,5,3',5'tetrametil benzidin (TMB), alkilamin veya ferriksilenol orange reaktiflerinin kullanıldığı her üç yöntemle ölçülebilmektedir (56).

Oksidatif stres; ateroskleroz, T2DM, PKOS ve inflamatuvar kronik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. PKOS'lu hastalarda kardiyovasküler hastalık oluşumunda yüksek TOS düzeyleri ile lipoproteinlerin okside olmasının rol oynadığı düşünülmektedir (47).

Serbest radikallere bağlı olarak meydana gelen oksidatif strese karşı korunma mekanizmaları önleyici, tamir edici ve antioksidanlarla savunma sistemlerini içermektedir. Enzimatik olarak serbest radikallerle mücadele; süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve PON1 aracılığıyla meydana gelmektedir. Enzimatik olmayan savunma sistemleri; askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler ve albumin, ferritin gibi büyük molekülleri

içermektedir (53, 54). Enzimatik olmayan TAOS düzeyleri deneysel olarak 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) veya ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi ile ölçülebilmektedir (57). PKOS'lu hastalarda kronik inflamasyon nedeniyle ortaya çıkan TOS, TAOS tarafından ortadan kaldırılmaya çalışılır (58-60). Son yıllarda yapılan çalışmalarda PKOS'lu hastalarda yüksek düzeyde bulunan ve androjenik özelliği olan dehidroepiandrostenedionsülfat (DHEAS)'nin anti-oksidan özellikleri bildirilmiştir (61).

## 2.7. Paraoksonaz

Paraoksonaz (PON) [arildialkilfosfataz (EC 3.1.8.1)] ilk olarak aromatik karboksilik esterleri, organofosfatları ve sinir gazını hidrolize eden bir enzim olarak bulundu (62). İsimlendirilmesi, paraokson hidrolizi ve insektisit metaboliti olan paratiyondan esinlenerek yapılmaktadır. PON gen ailesi PON1, PON2 ve PON3'ten oluşmaktadır. Her biri anti-oksidan özelliğe sahip olup yaklaşık % 65 oranında aynı aminoasit sayısına sahiptir. Bu genler insanda 7. kromozomda kodlanmaktadır. PON1 ve PON3 çoğunlukla karaciğerde sentezlenmekte ve plazmada HDL'ye bağlı olarak taşınmaktadır (63). PON2 birçok dokuda yaygın ve özellikle arter duvarındaki makrofajlarda ve lipoproteinlerden bağımsız olarak bulunmaktadır (64). PON1 bu ailenin en çok çalışılan üyesidir ve 354 aminoasit içeren ve 45 kDa ağırlığında insan 7. kromozomunun uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında *PON1* geni tarafından kodlanan glikoprotein yapıda bir enzimdir (65). Genetik olmayan birçok faktör bu enzimin aktivitesini etkilemektedir. Okside olmuş kızartma yağı tüketimi, sigara içilmesi aktivitesini azaltırken vitamin C ve E gibi anti-oksidanların kullanımı aktivitesini artırmaktadır (66, 67). PON1 enzimi fenil asetat ve homosistein tiyolaktonu substratı olarak kullanarak sırasıyla arilesteraz (ARE) ve homosistein tiyolaktonaz (HTLaz) aktivitesi göstermektedir (68).

HDL yapısında yer alan PON1 enzimi lipid peroksidlerin detoksifikasyonunda görev alarak anti-oksidan etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda PON1 enziminin lipoproteinlerin okside olmasını engelleyerek ateroskleroz gelişim riskini azalttığı belirtilmektedir (69, 70).

PKOS'lu hastalarda bulunan kronik, subklinik inflamasyon ve oksidan parametrelerdeki artış nedeniyle HDL yapısında yer alan PON1 enzim aktivitesinin varlığı ateroskleroz gelişimini de engelleyecektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereçler

#### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler

Tris HCl (Sigma)

Kalsiyum klorür (Horasan Kimya)

Fenilasetat (Aldrich)

HEPES (Sigma)

L-homosistein tiyolaktin (Sigma)

DTNB (Sigma)

#### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre (UV-1700 UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu)

Vorteks (Daigger vortex genie 2)

pH metre (Consort C830)

Buzdolabı (Arçelik)

-80°C derin dondurucu

Buz makinası (Focchetti AF100)

Distile su cihazı (Barnstead nanopure infinity)

Hassas terazi (Shangping FA1104N)

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Labart SH-5 heating stirrer)

TANİTA

Biyokimya analizörü Beckmann Coulter AU 480

Hormon analizörü Beckmann Coulter DXI 600

ELISA mikropak okuyucu (Molecular Devices Spectramax M2)

### 3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Hasta ve kontrol grupları klinik, radyolojik ve biyokimyasal açıdan değerlendirildi. Hasta ve sağlıklı grupları oluşturan kişilerden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar Kırıkkale Üniversitesi Hastanesi Kadın

Hastalıkları ve Doğum Polikliniğinde toplandı. Bu çalışma için etik kurul izni, Kırıkkale Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alındı (29.06.2012/06).

### **3.2.1. Hasta Grubunun Oluşturulması**

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine Mayıs-Kasım 2012 tarihleri arasında başvuran, 18-40 yaş arası, bilinen over veya uterus patolojisi olmayan, konjenital adrenal hiperplazisi olmayan, hiperprolaktinemi ve tiroid hastalığı bulunmayan, VKİ  $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup> olan, 40 PKOS'lu hastadan kan örnekleri alındı. Hastalar Rotterdam Kriterlerine göre değerlendirildi. Buna göre çalışmaya biyokimyasal hiperandrojenemi (DHEAS  $> 404.1\mu\text{g/dL}$  veya tT  $> 0.61\text{ng/mL}$  veya sT  $> 2.12\text{pg/mL}$ ) ve klinik hiperandrojenemi (oligomenore-amenore veya hirsutizm veya androjenik alopesi veya akne) bulguları olan ve/veya USG'de polikistik over görünümü (tek over hacmi  $> 10\text{cm}^3$  veya tek overde folikül sayısı  $\geq 12$ ) bulunan kadın hastalar dahil edildi.

### **3.2.2. Kontrol Grubunun Oluşturulması**

Kontrol grubuna sağlıklı, normal menstrual siklusu sahip, hirsütizmi olmayan, biyokimyasal ve klinik olarak hiperandrojenemi bulguları gözlenmeyen, USG'de polikistik görünümü bulunmayan, VKİ  $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup> olan, 18-40 yaş arası 40 gönüllü kadın alındı.

### **3.3. Klinik Değerlendirme**

PKOS'lu hastalar ve kontrol grubu hakkındaki bilgiler değerlendirme formlarına kaydedildi. Hastalar ve kontrol grubu menarş yaşı, adet düzeni açısından sorgulandı. Bel ve kalça çevresi ölçümleri yapıldı, bel/kalça oranı hesaplandı, kilo ve boy ölçümleri alınarak VKİ hesaplandı. Vücut yağ oranı ölçümü, TANİTA vücut analiz cihazı ile yapıldı. Hirsütizm Ferriman Gallwey Skorlama (FGS) sistemi kullanılarak değerlendirildi ve tüm gönüllüler akne açısından (var/yok) muayene edildi. Aynı gün tüm hastalara USG yapıldı.



### 3.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Serumların Ayrılması

Hasta ve kontrol gruplarında yer alan kişilerden 12 saat açlık sonrası açlık kan şekeri (AKŞ), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), trigliserid (TG), total kolesterol (TK), insulin, folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), östrodiol (E2), tiroid uyarıcı hormon (TSH), prolaktin (PRL), dehidroepiandrostenedionsülfat (DHEAS), androstenedion, total testosteron (tT), serbest testosteron (sT), seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ölçümü için kan alındı. Alınan kan örnekleri 4000 xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra serumları pastör pipetiyle ayrıldı ve -80 °C'de saklandı. Örnekler Kırıkkale'den Hacettepe Üniversitesi'ne kuru buz içerisinde nakledildi.

### 3.5. Yöntemler

#### 3.5.1. VKİ Hesaplanması

Hasta ve kontrol grubunda ağırlık ve boy ölçümü yapıldıktan sonra VKİ hesaplaması yapıldı. VKİ 'Formül 1' kullanılarak hesaplandı (6). VKİ 25 kg/m<sup>2</sup>'nin altında olanlar normal kitle indeksi olarak kabul edildi.

Formül 1.  $VKİ = \text{Ağırlık (kg)} / \text{Boy}^2 (\text{m}^2)$

#### 3.5.2. İnsulin Direnci Hesaplanması

Hasta ve kontrol serumlarında açlık glukoz ve insulin düzeyleri ölçüldü. Aşağıda yer alan 'Formül 2' Kullanılarak homeostatik model ile insülin direnci (HOMA-IR) hesaplandı (10).  $HOMA-IR \geq 2,5$  olan değerler insülin direnci (+) olarak değerlendirildi.

Formül 2.  $HOMA-IR = \text{Açlık Kan Glukozu (mg/dL)} \times \text{Açlık İnsulini (IU/mL)} \times 405$

#### 3.5.3. Serbest Androjen İndeksi (FAI) Hesaplanması

FAI hasta ve kontrol serumlarında çalışılan SHBG ve tT düzeylerinin kullanıldığı 'Formül 3' yardımı ile hesaplandı (71).

Formül 3.  $FAI = 100 \times 3,47 \times \text{tT (ng/mL)} / \text{SHBG (nmol/L)}$

### 3.5.4. Klinik Biyokimya ve Hormon Testleri

AKŞ, HDL, TK, TG testleri enzimatik kolorimetrik yöntem ile AU480 model otoanalizörde (Beckman Coulter, ABD) çalışıldı. LDL Friedewald formülü,  $LDL=TK-[HDL+(TG/5)]$ , kullanılarak hesaplandı. DHEAS, tT, insulin, FSH, LH, E2, TSH, PRL testleri, elektrokemilüminesans yöntemle çalışan, DXI600 model otoanalizörde (Beckman Coulter, ABD) ölçüldü. sT, androstenedion, SHBG, mikro enzim bağlı immünassay (ELISA) yöntemiyle çalışıldı.

### 3.5.5. TNF- $\alpha$ Düzeyi Ölçümü

TNF- $\alpha$  düzeyi, Diasource marka TNF- $\alpha$  EASIA (Louvain-la-Neuve, Belçika) kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle tayin edildi. Ölçümler iki kez tekrarlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirmeler yapıldı. Kitin çalışma içi ve çalışmalar arası % CV değerleri sırasıyla % 6.6 ve % 4.5 olarak belirlendi.

### 3.5.6. PGRN Düzeyi Ölçümü

Progranulin, R&D System Quantikine<sup>®</sup> Human Progranulin Immunassay (Minneapolis, MN, ABD) kiti kullanılarak, ELISA yöntemiyle tayin edildi. Ölçümler iki kez tekrar edildi ve ortalamalar alınarak değerlendirmeler yapıldı. Kitin çalışma içi tekrarlanabilirlik % CV değeri 4.4, çalışmalar arası % CV değeri 7.4 olarak belirlendi.

### 3.5.7. TOS Düzeyi Ölçümü

TOS düzeyi, enzim olmayan tüm reaktif oksijen radikallerini ölçebilen 'Rel Assay Diagnostics Total Oxidant Status Assay' kitiyle, manuel pipetlenerek ve spektrofotometrik olarak ölçüldü (56). Analiz yöntemi, örnek içerisinde bulunan reaktif oksijen türleri varlığında ferröz-o-dianisidine kompleksinin ferrik forma okside olması temeline dayanmaktadır. Ferrik form asidik ortamda 'xsenol orange' ile renkli bir kompleks oluşturmakta ve 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Bu test hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile kalibre edildi ve sonuçlar  $\mu molH_2O_2Equiv/L$  olarak verilmektedir. Ölçümler iki kez tekrarlanarak değerlendirmeler ortalamalar üzerinden yapıldı.

### 3.5.8. TAOS Düzeyi Ölçümü

TAOS analizi, enzim olmayan tüm anti-oksidan molekülleri tayin edebilen ‘Rel Assay Diagnostics Total Antioxidant Status Assay’ kitiyle, manuel pipetlenerek ve spektrofotometrik olarak yapıldı (57). Bu yöntem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin asidik ortamda (asetat tamponu pH: 3,6) ABTS’yi radikal katyon formu olan ABTS<sup>•+</sup>’ye okside etmesi temeline dayanmaktadır. Ortam pH’ı yükseldikçe koyu yeşil olan ABTS<sup>•+</sup> solmaktadır. Ortamda antioksidan varlığında renkteki açılma daha hızlı olmaktadır. Solma hızı ile ortamdaki antioksidan konsantrasyonu ters orantılıdır. Renkteki solma 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Reaksiyon hızı troloks ile kalibre edildi ve sonuçlar mmolTroloxEquiv/L olarak ifade edildi. Ölçümler iki kez tekrarlanarak değerlendirmeler ortalamalar üzerinden yapıldı.

### 3.5.9. PON1 Aktivite Ölçümü

PON1 enzim tayini fenilasetatın substrat olarak kullanıldığı ARE aktivitesi ve homosistein tiyolaktonun substrat olarak kullanıldığı HTLaz aktivitesi üzerinden yapıldı.

**ARE Aktivite Tayini:** ARE aktivitesi ölçümü için substrat olarak fenilasetat kullanıldı. Yöntem fenilasetatın enzim ile hidrolizi sonucu oluşan fenolün 270 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. 50 mM tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid (Tris-HCl) (pH 8) içerisine 1 mM kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) eklenerek reaksiyon ortamı oluşturuldu. Reaksiyon ortamına son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde fenilasetat ve uygun miktarda serum ilavesiyle reaksiyon başlatıldı ve 1 dakika sonra 270 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümler yapıldı. Fenolün molar absorbtivite katsayısı  $\epsilon_{270}=1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  olarak alındı. ARE aktivite birimi, dakikada hidroliz edilen 1  $\mu\text{mol}$  fenilasetat olarak tanımlandı (72, 73). Ölçüm üç defa tekrarlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirmeler yapıldı.

**HTLaz Aktivite Tayini:** HTLaz aktivitesi ölçümü için substrat olarak homosistein tiyolakton kullanıldı. Ölçüm, homosistein tiyolaktonun enzimatik olarak hidrolize olması ile oluşan serbest hidroksil gruplarının 5,5’- dithiobis (2 - nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tepkimeye girmesi sonucunda oluşan renkli bileşiğin

spektrofotometrik olarak okunması ile gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamı 50 mM HEPES tamponu (pH 7.4) içerisinde son konsantrasyonu 1 mM DTNB olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde homosistein tiyolaktan ve uygun miktarda enzim ilave edildi ve reaksiyon başlatıldı. 30 saniye sonra 2-nitro-5-tiyobenzoik asit (TNB) ile elde edilen sarı renk 412 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. TNB için molar absorbtivite katsayısı  $\epsilon_{412}=13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  olarak alındı. HTLaz aktivite birimi, dakikada oluşan 1  $\mu\text{mol}$  TNB olarak tanımlandı (73, 74). Ölçümler üç defa tekrarlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirildi.

### 3.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme Windows için 'IBM SPSS Statistics 20' (New York, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılıma uymayan veriler için logaritmik dönüşüm uygulandı ve normal dağılıma uyum göstermesi sağlandı. 'Kolmogrov Smirnov Testi' ve grafik yöntemiyle verilerin normalitesi kontrol edildi. Normal dağılıma uyum sağlayan gruplar arası karşılaştırmalar 'Independent Sample-T Test' ile normal dağılıma uyum göstermeyenler arasındaki karşılaştırmalar ise 'Mann Whitney U Testi' kullanılarak yapıldı. Gruplar arası korelasyon değerlendirmeleri 'Pearson Testi' kullanılarak yapıldı. Tüm değişkenler için  $p \leq 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Yaş, bel/kalça oranı ve VKİ değerleri bakımından karşılaştırıldığında PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.1). Kontrol grubunun vücut yağ kitlesi ve yüzdesi PKOS'lu hasta grubuna göre daha yüksekti. Sistolik ve diyastolik kan basınçları (SKB ve DKB) her iki grupta normal sınırlarda bulundu. PKOS'lu hasta grubu ve kontrol grubunda VKİ'nin HDL/LDL oranı ile negatif korelasyon gösterdiği saptandı ( $r=-0,362$ ,  $p=0,022$ ,  $r=-0,537$ ,  $p<0,001$ ).

PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında hiperandrojenemi değerlendirilmesi için gerekli biyokimyasal belirteçler ve klinik bulgular açısından anlamlı farklılıklar saptandı. PKOS'lu hasta grubunda kontrol grubuna göre FAI, tT, DHEAS, FGS değerleri daha yüksek bulundu (Tablo 4.2)

HOMA-IR değerleri karşılaştırıldığında kontrol ve PKOS'lu hasta grupları arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi ( $p=0,724$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.1.** Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunun tanımlayıcı özellikleri

	Birim	Kontrol			Hasta			p değeri
		Ortalama±SD	Min	Mak	Ortalama±SD	Min	Mak	
<b>Yaş</b>	Yıl	21,5±7,75 <sup>c</sup>	18	34	21,5±3,75 <sup>c</sup>	18	32	0,173 <sup>a</sup>
<b>VKİ</b>	kg/m <sup>2</sup>	22,2±3,4	15,8	31,1	20,9±2,6	15	25,4	0,066 <sup>d</sup>
<b>Bel/Kalça Oranı</b>		0,74±0,05	0,66	0,87	0,74±0,07	0,63	0,91	0,827 <sup>b</sup>
<b>Vücut Yağ Kütlesi</b>	kg	22,5±8,2	3	39,3	19,7±8,2	3	47,7	0,155 <sup>d</sup>
<b>Vücut Yağ %'si</b>	%	14,2±7,6	2	34,1	12±8,6	1,3	50,4	0,104 <sup>b</sup>
<b>SKB</b>	mmHg	110±20 <sup>c</sup>	90	120	110±20 <sup>c</sup>	90	130	0,385 <sup>a</sup>
<b>DKB</b>	mmHg	70±0 <sup>c</sup>	60	80	70±2,5 <sup>c</sup>	60	80	0,596 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mann Whitney U testi ile değerlendirildi <sup>b</sup>Logaritmik dönüşüm uygulandı ve t-test ile değerlendirildi <sup>c</sup>Ortanca±IR değerleri <sup>d</sup>t-test ile değerlendirildi

VKİ Vücut Kitle İndeksi; SKB Sistolik Kan Basıncı; DKB Diyastolik Kan Basıncı

**Tablo 4.2.** Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunun hormonal açıdan değerlendirilmesi

	Birim	Kontrol			Hasta			p değeri
		Ortalama±SD	Min	Mak	Ortalama±SD	Min	Mak	
<b>DHEAS</b>	µg/dL	216,6±81,9	99,5	399,1	264,8±109,7	98,2	579,4	0,038 <sup>d</sup>
<b>SHBG</b>	nmol/L	66,1±31,2	12,38	143,61	47±30,9	6,35	180,17	0,005 <sup>b</sup>
<b>tT</b>	ng/mL	0,39±0,21 <sup>c</sup>	0,12	1,08	0,58±0,21 <sup>c</sup>	0,16	1,09	<0,001 <sup>a</sup>
<b>FAI</b>		2,89±2,36	0,44	11,5	6,22±5,5	0,96	29,51	<0,001 <sup>b</sup>
<b>FGS</b>		2,18±1,71	0	6	11,21±4,68	2	21	<0,001 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Mann Whitney U testi ile değerlendirildi <sup>b</sup>Logaritmik dönüşüm uygulandı ve t-test ile değerlendirildi <sup>c</sup>Ortanca±IR değerleri <sup>d</sup>t-test ile değerlendirildi

DHEAS Dehidroepiandrostenedionsülfat; SHBG Seks Hormon Bağlayıcı Globulin; tT Total Testosteron; FAI Serbest Androjen İndeksi; FGS Ferriman Gallwey Skoru

**Tablo 4.3.** Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunun biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi

	Birim	Kontrol			Hasta			p değeri
		Ortalama±SD	Min	Mak	Ortalama±SD	Min	Mak	
PGRN	ng/mL	63,4±17,2	29,5	90,1	73±21,6	37,7	136,2	0,037 <sup>d</sup>
TNF- $\alpha$	pg/mL	16,4±20,9	0,83	86,6	37±46,6	0,67	232,4	0,041 <sup>b</sup>
ARE	IU/mL	67±13	45,9	94,4	76,19±18,6	42	117,6	0,009 <sup>d</sup>
HTLaz	IU/mL	13,46±3,53	8,68	27,8	13,71±2,53	9,56	20,6	0,721 <sup>d</sup>
TOS	$\mu$ mol/L	6,04±2,12	2,42	13,38	5,56±2,72	2,52	14,27	0,141 <sup>b</sup>
TAOS	mmol/L	0,96±0,34	0,34	1,98	1,13±0,35	0,45	1,93	0,038 <sup>d</sup>
HOMA-IR		1,36±0,77	0,51	4,23	1,46±0,81	0,29	3,61	0,724 <sup>b</sup>
HDL	mg/dL	52,40±8,52	34	73	56,1±12,8	24	79	0,131 <sup>d</sup>
LDL	mg/dL	103,4±28,2	64	174	92,8±25,6	60	184	0,069 <sup>b</sup>
HDL/LDL		0,54±0,16	0,24	0,88	0,65±0,22	0,27	1,12	0,023 <sup>d</sup>
TG	mg/dL	100,2±46,7	27	213	90,1±41,2	39	203	0,348 <sup>b</sup>
TK	mg/dL	171±45,2 <sup>c</sup>	117	251	163±26,8 <sup>c</sup>	135	261	0,197 <sup>a</sup>

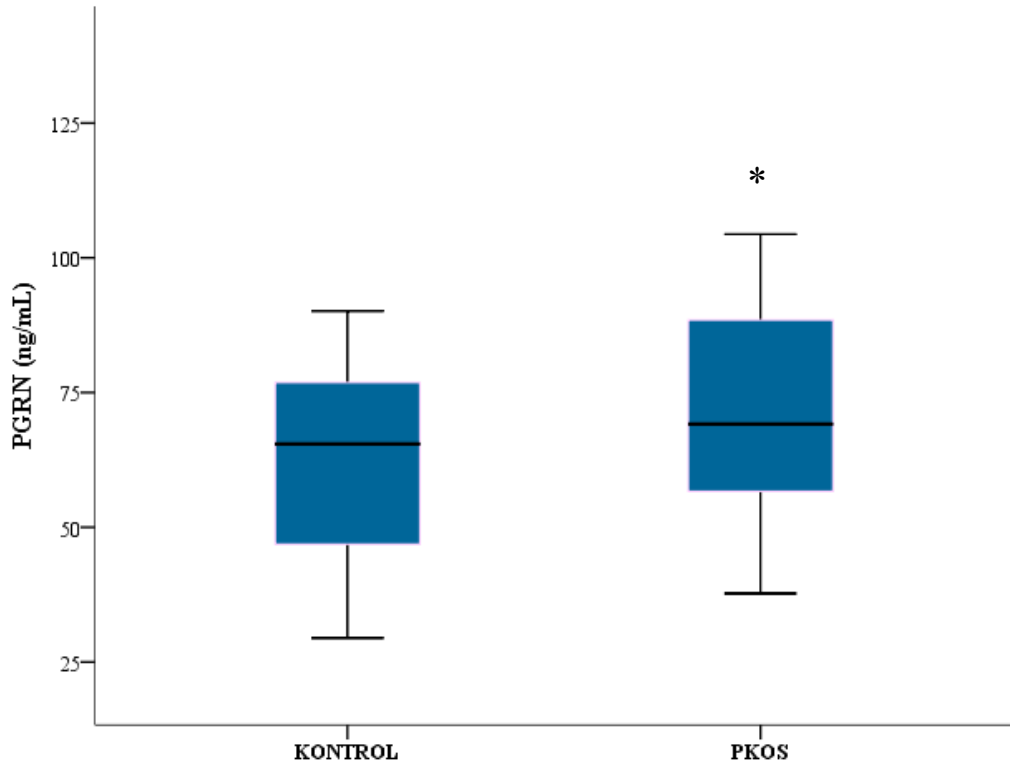
<sup>a</sup>Mann Whitney U testi ile değerlendirildi <sup>b</sup>Logaritmik dönüşüm uygulandı ve t-test ile değerlendirildi

<sup>c</sup>Ortanca±IR değerleri <sup>d</sup>t-test ile değerlendirildi

PGRN Progranulin; TNF- $\alpha$  Tümör Nekrozis Faktör-alfa; ARE Arilesteraz; HTLaz Homosistein Tiyolaktonaz; TOS Total Oksidatif Kapasite; TAOS Total Anti-Oksidan Kapasite; HOMA-IR Homeostatik Model İle İnsulin Direnci Değerlendirmesi; HDL Yüksek Dansiteli Lipoprotein; LDL Düşük Dansiteli Lipoprotein; TG Trigliserid; TK Total Kolesterol

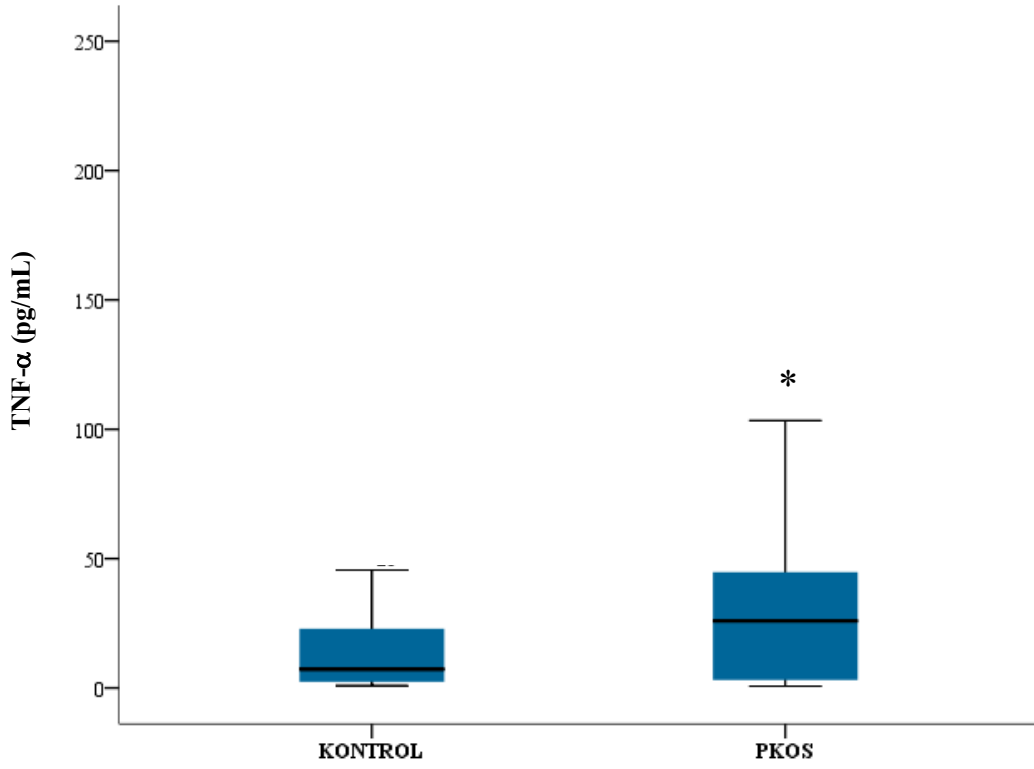


PKOS'lu hastaların serum PGRN düzeyleri ( $73 \pm 21,6$ ) kontrol grubu ( $63,4 \pm 17,2$ ) ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu gözlemlendi. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,037$ ) (Tablo 4.3) (Şekil 4.1). Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri aynı şekilde PKOS'lu hasta grubunda ( $37 \pm 46,6$ ) daha yüksek bulundu. Kontrol grubu ( $16,4 \pm 20,9$ ) ile karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p=0,041$ ) (Tablo 4.3, Şekil 4.2).



\* $p < 0,05$

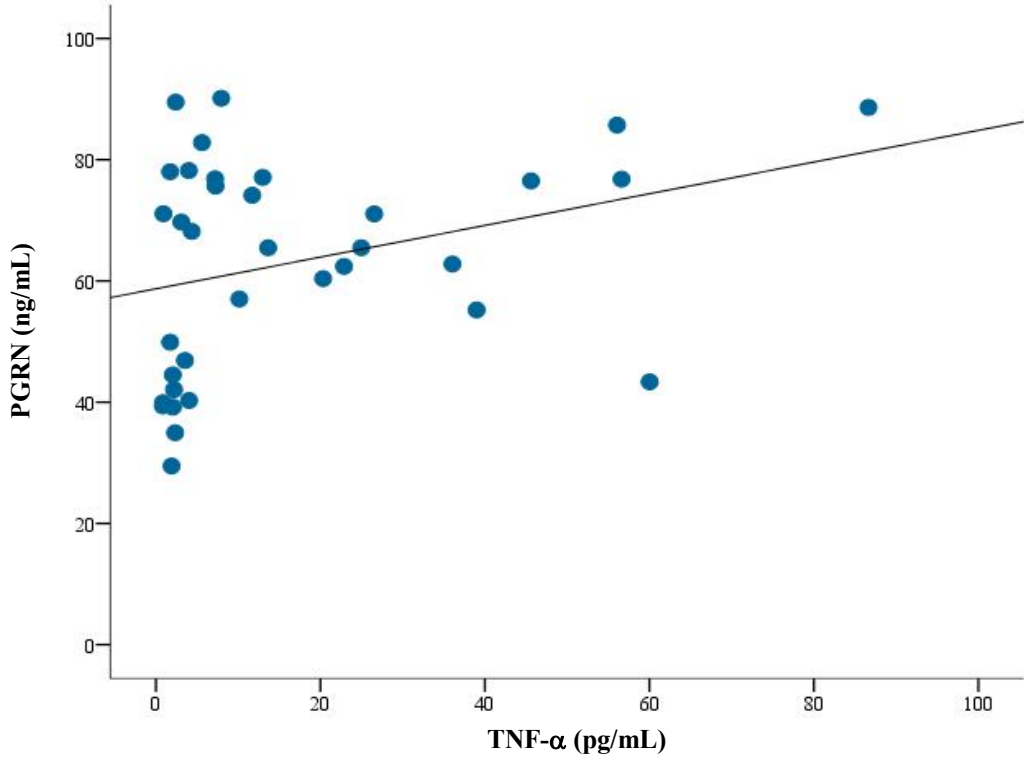
Şekil 4.1. PKOS'lu hasta ve kontrol gruplarının PGRN düzeyleri



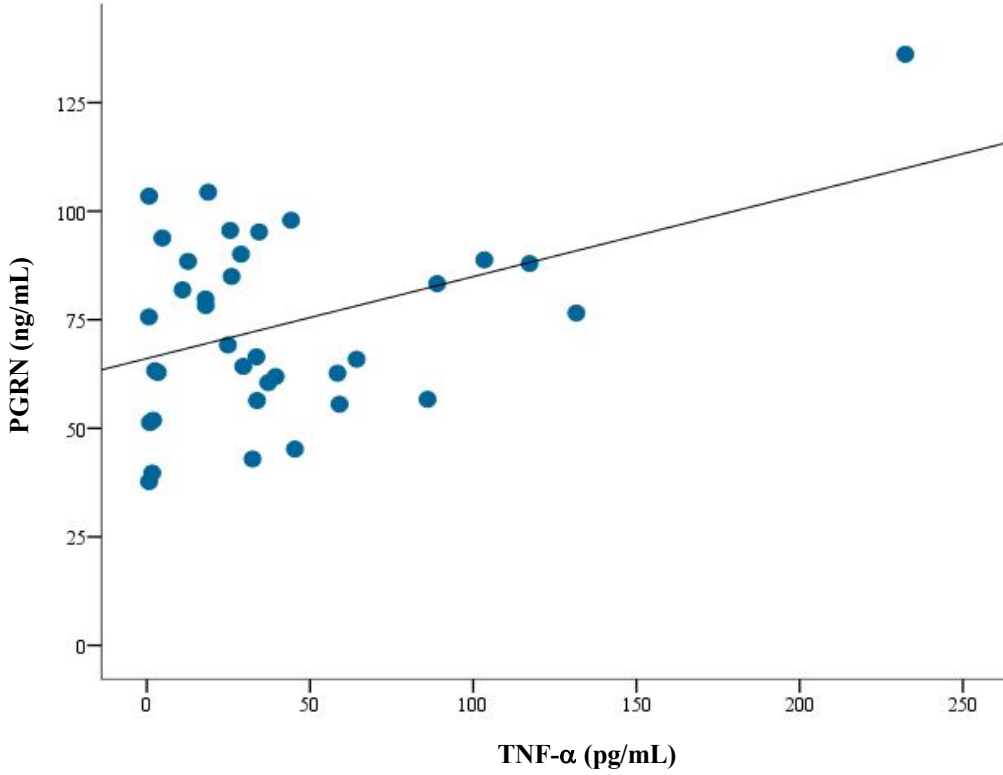
\*p<0,05

Şekil 4.2. PKOS'lu hasta ve kontrol gruplarının TNF- $\alpha$  düzeyleri

PKOS'lu hasta ve kontrol grubu serum PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında paralel artış gözlemlendi. Şekil 4.3'te PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında kontrol grubundaki paralel artış, Şekil 4.4'te ise hasta grubundaki paralel artış gözlenmektedir.



Şekil 4.3. Kontrol grubunda PGRN ve TNF- $\alpha$  arasındaki korelasyon

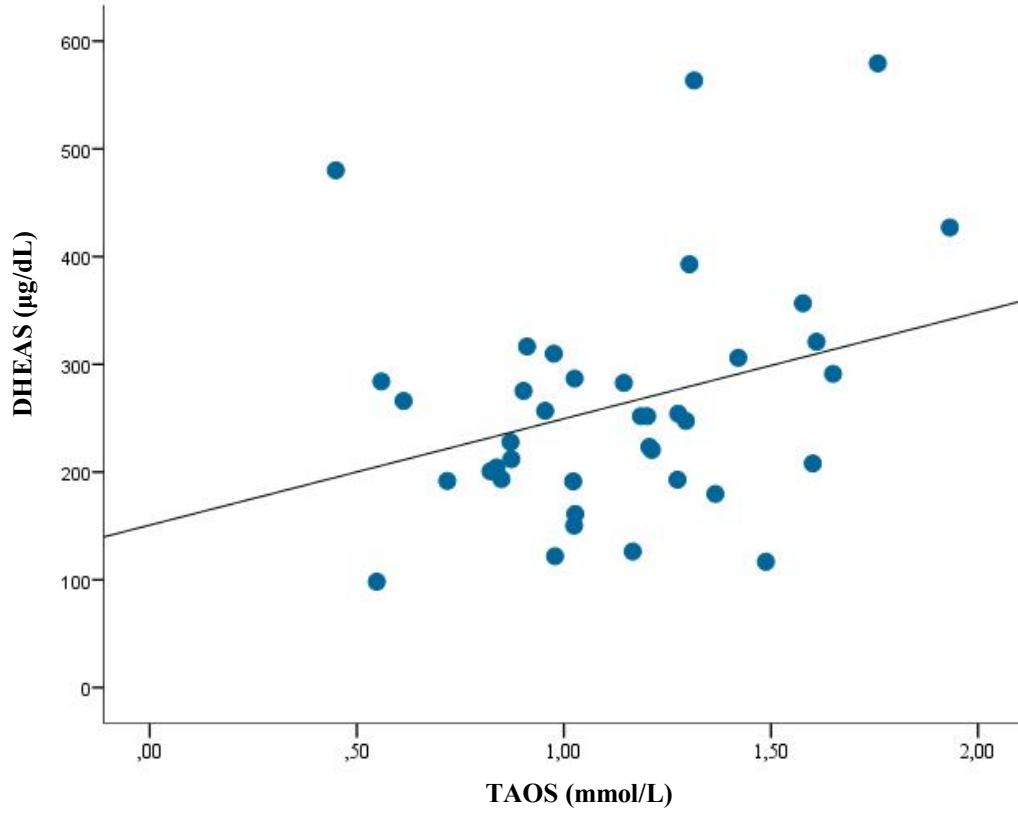


Şekil 4.4. PKOS'lu hasta grubunda PGRN ve TNF- $\alpha$  arasındaki korelasyon

PKOS'lu hasta ve kontrol grupları serum LDL, HDL, TG ve TK düzeyleri açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak HDL/LDL oranı değerlendirildiğinde PKOS'lu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3). HDL üzerinde yer alan PON1 etkinliğini gösteren ARE aktivitesi PKOS'lu hasta grubunda daha yüksek ölçüldü ve gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 4.3). PON1 aktivitesini gösteren homosistein tiyolaktan ile yapılan ölçümlerde ise HTLaz aktivitesi, PKOS'lu hastalarda ( $13,71\pm 2,53$ ) kontrol grubuna ( $13,46\pm 3,53$ ) göre daha yüksek bulundu ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0,721$ ) (Tablo 4.3).

Serum total oksidan kapasitesini gösteren TOS ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 4.3).

Serum total anti-oksidan kapasitesini gösteren TAOS ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde ise PKOS'lu hasta grubunda daha yüksek olduğu görüldü. TAOS düzeyleri ortalamaları, kontrol grubunda ve PKOS'lu hasta grubunda sırasıyla  $0,96\pm 0,34$  ve  $1,13\pm 0,35$  olarak ölçüldü. Gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,038$ ) (Tablo 4.3). PKOS'lu hasta grubunda ölçülen TAOS düzeyi ile DHEAS düzeyleri arasında pozitif yönde orta dereceli istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulundu ( $r=0,312$ ,  $p=0,05$ ) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PKOS'lu hasta grubunda DHEAS ve TAOS arasındaki korelasyon

## TARTIŞMA

Burghen ve arkadaşları ilk kez 1980 yılında PKOS ile insülin direnci arasında bir bağlantı olabileceğini ve PKOS'lu vakaların yaklaşık % 80'inde insülin direnci olduğunu rapor etmişlerdir (75). İlerleyen dönemlerde yapılan çalışmalarda, hiperinsülineminin androjen sentezi artışına neden olarak PKOS patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (5). İnsulinin hipofizden LH salınımını uyardığı, LH'nın overler üzerinde androjen sentezini artırdığı belirtilmektedir. Bunun yanında hücre kültürü çalışmalarında insulin ve insulin benzeri büyüme faktörleri artışı ile LH'nın teka hücrelerine olan afinitesinin artmış olduğu bildirilmektedir (76, 77). Literatürde özellikle obez PKOS'lu hastaların HOMA-IR değerlerinin hasta olmayan kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar yer almaktadır. Normal VKİ'ne sahip PKOS'lu hasta grubunda yaklaşık % 50 oranında insulin direnci meydana geldiği belirtilmektedir (5, 78-80). Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda insülin direncini gösteren HOMA-IR değerlerinin normal sınırlarda olduğu bulundu. Ayrıca insülin direnci yönünden değerlendirildiğinde her iki grup arasında farklılık olmadığı görüldü. Bunun nedeni çalışmamıza dahil edilen PKOS'lu grubun obez değil normal VKİ'ne sahip zayıf (Lean PCOS) hastalardan meydana gelmesi olabilir. Ayrıca bu hastalarda, henüz tanı almış ve ilk kez polikliniğe başvuru yapmış olmaları nedeniyle obezite ve insulin direnci bulgularının oluşması için gerekli süreç henüz tamamlanmamış olabilir. Bunun dışında normal VKİ'ne sahip PKOS'lu hastalarda kronik inflamasyon bulgularının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (78, 80). Bizim çalışmamızda Tablo 4.1'de yer alan VKİ, bel/kalça oranı, vücut yağ kitlesi ve yüzdesi değerlerine bakıldığında hasta ve kontrol grupları arasında farklılık olmadığı görülmektedir. Hastaların genç, yeni tanı almış ve zayıf PKOS'lu gruptan olmaları nedeniyle vücut yağ yüzdesi, bel/kalça oranları ve VKİ ( $25 \text{ kg/m}^2$ 'nin altında) parametrelerinin normal sınırlarda olması beklenen bir bulgudur. Aynı hasta grubunda takip devam ettiğinde bu parametrelerde değişiklikler meydana gelmesi mümkün olabilir. Diğer taraftan, seçilen PKOS'lu hastaların obez olması durumunda Tablo 4.1'de yer alan ölçüm parametrelerinin ve HOMA-IR değerlerinin farklılık göstereceği ve normal sınırlar dışında bulunabileceği düşünülmektedir. Bu bakımdan daha sonra yapılacak çalışmalarda, bu karşılaştırmanın normal VKİ'li PKOS'lu hastalar ve obez PKOS'lu

hastalar ile normal VKİ'ne sahip sağlıklı kişiler ve PKOS tanısı almamış obez gruplar arasında yapılmasının daha bilgi verici olacağı sonucuna varıldı.

TNF- $\alpha$ 'nın adipoz doku ve inflamatuvar hücrelerden salgılandığı ve interlökin-1 ile birlikte sistemik inflamasyonu tetiklediği bilinmektedir. Ayrıca insülin sinyal iletiminde fosforilasyon düzeyinde farklılıklar meydana getirmekte ve adipoz dokuda da inflamatuvar bir süreci başlatmaktadır. Adipoz dokuda inflamasyon ve insülin direnci gelişiminde anahtar rolü oynayan molekül TNF- $\alpha$ 'dır. Bu çalışmada insülin direncinden bağımsız olarak, kontrol ve PKOS'lu hasta gruplarında serum PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde artış izlendi ve her iki adipositokindeki artış hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu. PKOS'da TNF- $\alpha$  salınımindaki artışı takiben gelişen kronik, subklinik inflamasyon ile beraber serum PGRN düzeylerinin de yükselmesi ve bu iki parametredeki artışın paralellik göstermesi yeni bir bulgudur. PGRN'in TNF- $\alpha$  reseptörüne bağlandığı ve etkilerini aynı reseptör üzerinden gösterdiği bilinmektedir. PKOS'lu hastalarda PGRN'in TNF- $\alpha$ 'ya paralel olarak artışı ve anti-inflamatuvar etkilerinin bilinmesi nedeniyle PGRN'nin reseptör düzeyinde TNF- $\alpha$  ile bir yarışmaya girebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde TNF- $\alpha$ 'nın insülin direnci oluşturmasını inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Hotamışlıgil ve ark. Tarafından ilk kez TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonunun ve TNF- $\alpha$  düzeyinin adipoz dokuda artmış olduğu ve obeziteye bağlı insülin direnci ve T2DM ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (81). TNF- $\alpha$  düzeyinin artması, insülin sinyal iletiminde rolü olan IRS-1/2 moleküllerinin tirozin aminoasidi üzerinden değil serin aminoasidi üzerinden fosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu durum insülin sinyal iletimini inhibe etmekte ve insülin direncine yol açmaktadır. TNF- $\alpha$  etkisinin engellendiği obez fa/fa sıçanlarda insüline cevap olarak dokulara glukoz girişinin arttığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda PKOS'lu hasta ve kontrol grubunda yeterli sayıda obez ve insülin direncine sahip olan bireyler bulunmadığından PGRN ve TNF- $\alpha$ 'nın insülin direnci ile olan ilişkisi yorumlanamamıştır. HOMA-IR'si normal ve yüksek olan PKOS'lu hasta gruplarının HOMA-IR'si normal sağlıklı ve HOMA-IR'si yüksek PKOS'u olmayan

kontrol grupları ile serum PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından karşılaştırılması bu iki parametrenin insulin direnci ile olan ilişkisini daha iyi açıklayabilir.

Santral obezitenin kronik, subklinik inflamasyonla ilişkili olduğu ve bunun kardiyovasküler hastalık riskini artırdığı bilinmektedir (82-85). PKOS'lu hastalarda genellikle santral obezite bulunmaktadır. Santral obezitede adipoz dokuda bulunan mononükleer hücreler makrofajlara dönüşerek TNF- $\alpha$  salgılanmasında artışa neden olmakta ve inflamasyon sürecini başlatmaktadır (14, 33, 82). Aynı zamanda TNF- $\alpha$  düzeylerinin PKOS'lu hastalarda VKİ'den bağımsız olarak artış gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (78). Gonzalez ve ark. tarafından yapılan çalışmada normal VKİ'li PKOS'lu hastaların TNF- $\alpha$  düzeylerinin normal VKİ'li kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (78). Aynı çalışmada TNF- $\alpha$  düzeylerinin obez PKOS'lu hastalar ve obez kontrollerde, normal VKİ'li PKOS'lu hastalar ve normal VKİ'li kontrollere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kontrol grubu ve PKOS'lu hasta grubunun normal VKİ'li bireylerden meydana gelmesine rağmen TNF- $\alpha$  düzeylerinin PKOS'lu hasta grubunda kontrollere göre daha yüksek olduğu görüldü. Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunda, yağ dokusundan salınan ve TNFR'yi kullanan PGRN'nin serum düzeylerinin, VKİ'den ve vücut yağ kitlesinden bağımsız olarak TNF- $\alpha$  düzeylerine paralel artış gösterdiği bulundu. Bu sonuç daha sonra yapılacak olan araştırmalar için yol göstericidir. PKOS'lu hasta grubunda PGRN'nin yükselmesiyle birlikte TNF- $\alpha$ 'nın neden olduğu inflamasyon ve insulin direnci mekanizmalarında moleküler düzeyde bir inhibisyon meydana geliyor olabilir.

Literatürde PKOS'lu hastalarda ARE aktivitesinin düşük seviyede olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (86, 87). Fenkci ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, kontrol grubunda HDL düzeyi PKOS'lu hasta grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (86). Bizim çalışmamızda ise PKOS'lu hastaların HDL düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek ölçülmüştür. Ayrıca HDL/LDL oranı PKOS'lu hasta grubunda anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. ARE aktivitesinin hasta grubunda daha yüksek olması çalışmamıza katılan PKOS'lu hastaların HDL düzeylerinin yüksek olması ile açıklanabilir. HTLaz aktivitesi de aynı şekilde PKOS'lu hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur. Bayrak ve ark. bir çalışmada PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında HDL düzeyleri bakımından



fark olmamasına rağmen HTLaz aktivitesinin hasta grubunda anlamlı bir düzeyde düştüğünü göstermişlerdir (88). Bizim çalışmamızda HTLaz açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Her ikisi de PON1 aktivitesini ölçmesine rağmen fenilasetatı substrat olarak kullanan ARE aktivitesi hasta grubunda yüksek bulundu ancak homosistein tiyolaktonu substrat olarak kullanan HTLaz aktivitesi aynı oranda yüksek ölçülemedi. Bu durum HTLaz aktivitesinin PON1 aktivitesini ölçmede yeterince spesifik olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle çalışmamızda PON1 aktivitesini değerlendirirken daha özgül olan ARE aktivitesi dikkate alınarak sonuçlar yorumlandı.

Daha önce yapılan çalışmalarda normoglisemik ve normal VKİ'ne sahip PKOS'lu hasta grubunda TOS ve TAOS düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (89). Ancak literatürde PKOS'lu hastalarda TAOS düzeyinin kontrol grubuna göre azalmış olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (57). Bu çalışmada hem TOS hem TAOS düzeylerinin ölçümü, her bir örnek iki kez çalışılarak ve ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak kontrol ve PKOS'lu hasta grupları arasında karşılaştırmalar yapıldığında TOS değerlerinin hasta grubunda daha düşük, TAOS değerlerinin ise yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca sonuçlar TOS ve TAOS ölçüm kitleri içinde yer alan prospektüse göre incelendiğinde her iki grubun TOS değerlerinin normal aralıkta yer aldığı, TAOS değerlerinin ise normalin altında kaldığı bulunmuştur.

Bazı araştırmacılar DHEAS'nin androjenik özellikleri dışında anti-oksidan olarak görev yapabildiğini ileri sürmektedirler. DHEAS'ın hiperglisemi ile oluşturulan, oksidan stresin artırıldığı hücre kültürü ortamlarında anti-oksidan özellikler gösterdiği bildirilmiştir (61). Bazı çalışmalarda ise DHEAS'ın oksidan moleküllerin sentezini azaltarak inflamasyon ve ateroskleroza önleyebileceği gösterilmiştir (89). Bizim sonuçlarımıza göre PKOS'lu hasta grubunda TAOS düzeyine paralel olarak DHEAS düzeyinin anlamlı bir artış gösterdiği bulundu. Çalışmamızda kullanılan TAOS kiti enzimatik olmayan tüm anti-oksidan parametreleri ölçtüğünden; DHEAS, anti-oksidan düzeylerindeki artışa katkı sağlamış olabilir. PKOS'lu hastalarda bir tanı kriteri olan ve bizim çalışmamızdaki hastalarda da yüksek bulunan DHEAS'ın serum düzeyleri TAOS ölçümlerindeki artışın nedeni olabilir. TAOS artışı, moleküler düzeyde radikalleri azaltarak hasta

grubundaki TOS ölçümlerinin düşük olmasını da açıklamaktadır. Literatürde PKOS'lu hastalarda DHEAS ve TAOS arasındaki ilişkiyi inceleyen yeterli sayıda çalışma olmadığından konu ile ilgili araştırmalara ihtiyaç vardır.

PKOS, moleküler mekanizmaları yönünden oldukça karmaşık ve metabolik sendromun da bir komponenti olarak çok sayıda hastalığın patogeneziyle etkileşen, çağımızın en yaygın hastalıklarından biridir. Çoğu zaman sinsi seyreden, geç belirti veren, doğurganlığı azaltan, kozmetik sorunlar dışında T2DM ve kardiyovasküler hastalıklar gibi mortalite nedeni olan PKOS'un inflamasyon, insülin direnci ve obezite ile olan ilişkisi yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Ancak tedavi olarak genellikle insülin direncini ortadan kaldıran ve ovulasyonu inhibe eden ilaçlar verilebilmektedir. Bu ilaçlar kesildiğinde ise semptomlar yeniden ortaya çıkabilmektedir. PKOS patogenezinde rol oynayan moleküller ve mekanizmalar yeterince aydınlatıldığında tedavisinde tam kür sağlanacaktır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bizim çalışmamızda PKOS'lu hasta ve kontrol grubu yaş, bel/kalça oranı ve VKİ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.
2. PKOS'lu hasta grubu ve kontrol grubunda VKİ'nin HDL/LDL oranı ile negatif korelasyon gösterdiği saptandı.
3. PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında hiperandrojenemi gösteren biyokimyasal belirteçler ve klinik bulgular açısından anlamlı farklılıklar bulundu.
4. Hasta grubunun FAI, tT, DHEAS, FGS değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu.
5. PKOS'lu hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında HOMA-IR değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı.
6. PGRN düzeyleri ortalaması PKOS'lu hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi.
7. TNF- $\alpha$  düzeyleri ortalaması PKOS'lu hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi.
8. Kontrol ve PKOS'lu hasta grubunda PGRN ve TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında paralel artış saptandı.
9. HDL/LDL oranı PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi ve hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu.
10. ARE aktivitesi, PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi.
11. HTLaz aktivitesi, PKOS'lu hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.
12. PKOS'lu hasta ve kontrol grupları arasında TOS değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.
13. TAOS düzeyleri PKOS'lu hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek ölçüldü. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu.
14. PKOS'lu hasta grubunda TAOS düzeyi ile DHEAS arasında pozitif yönde orta dereceli bir korelasyon olduğu saptandı.

### KAYNAKLAR

1. Dunaif, A. (1997). Insulin Resistance and The Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocrine Rev*, 18(6), 774-800.
2. Tsilchorozidou, T., Overton, C., Conway, G.S. (2004). The Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Clin Endocrinol*, 60, 1-17.
3. Mak, W., Dokras, A. (2009). Polycystic Ovarian Syndrome and The Risk of Cardiovascular Disease and Trombosis. *Semin Thromb Hemost*, 35, 613-620.
4. Vrbikova, J., Hainer, V. (2009). Obesity and Polycystic Ovary Syndrome. *Obesity Facts*, 2, 26-35.
5. Goodarzi, M.O., Dumesic, D.A., Chazenbalk, G., Azziz, R. (2011). Polycystic Ovary Syndrome: Etiology, Pathogenesis and Diagnosis. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 219-231.
6. Wild, R.A., Carmina, E., Diamanti-Kandarakis, E., Dokras, A., Escobar-Morreale, H.F., Futterweit, W., Lobo, R., Norman, R.J., Talbott, E., Dumesic, D.A. (2010). Assessment of Cardiovascular Risk and Prevention of Cardiovascular Disease in Woman with The Polycystic Ovary Syndrome: A Consensus statement by The Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab*, 95( 5), 2038-2049.
7. Repaci, A., Gambineri, A., Pasquali, R. (2011). The Role of Low-Grade Inflammation in The Polycystic Ovary Syndrome. *Mol Cel Endocrin*, 335, 30-41.
8. Ebejer, K., Agius, J.C. (2013). The Role of Cytokines in Polycystic Ovarian Syndrome. *Gynecol Endocrin*, Early Online:1-5.
9. Gonzalez, F. (2012). Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Undepinning of Insulin Resistance and Ovarian Dysfunction. *Steroids*, 77, 300-305.
10. Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H.F., Futterweit, W., Janssen, O.E., Legro, R.S., Norman, R.J., Taylor, A.E., Witchel, S.F. (2009). The Androgen Excess and PCOS Society Criteria for the Polycystic Ovary Syndrome: Complete Task Force Report. *Fertil Steril*, 91, 456-488.

11. Fauser, B.J.M., Tarlatzis, B.C. Rebar, R.W. Legro, R.S., Balen, A.H., Lobo, R., Carmina, E., Chang, J., Yıldız, B.O. Laven, J.S.E., Boivin, J., Petralgia, F., Wijeyeratne, C.N., Norman, R.J., Dunaif, A., Franks, S., Wild R.A., Dumesic, D., Barnhart, K. (2012). Consensus on Women's Health Aspects of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*, 97 (1), 28-38e25.
12. Carmina, E., Bucchieri, S., Mansueto, P., Rini, G.B., Ferin, M., Lobo, R.A. (2009). Circulating Levels of Adipose Products and Differences in Fat Distribution in The Ovulatory and Anovulatory Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome. *Fertil Steril*, 91, 1332–1335.
13. Glintborg, D., Andersen, M., Hagen, C., Frystyk, J., Hulstrøm, V., Flyvbjerg, A., Hermann, A.P. (2006). Evaluation of Metabolic Risk Markers in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Adiponectin, Ghrelin, Leptin and Body Composition in Hirsute PCOS Patients and Controls. *Eur J Endocrin*, 155, 337–345.
14. Xiong, Y., Liang, X., Yang, X., Li, Y., Wei, L. (2011). Low Grade Chronic Inflammation in The Peripheral Blood and Ovaries of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Eur J Obstet Gynecol*, 159, 148-150.
15. Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L., Kriegler, M. (1990). A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact. *Cell*, 63, 251-258.
16. Xu, H., Sethi, J.K., Hotamisligil, G.S. (1999). Transmembrane Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  Inhibits Adipocyte Differentiation by Selectively Activating TNF receptor 1. *J Biol Chem*, 274, 26287-26295.
17. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S.D. (1998). A Novel Form of TNF/Cachectin is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein, Ramifications for The Complex Physiology of TNF. *Cell*, 53, 45-53.
18. Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J.,

March, C.J., Cerretti, D.P. (1997). A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis Factor- $\alpha$  from Cells. *Nature*, 385, 729-733.

19. MacEwan, D.J. (2002). TNF Receptor Subtype Signalling: Differences and Cellular Consequences. *Cell Signal*, 14, 477-492.

20. Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. (2000). A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science*, 288, 2351.

21. Wu, H., Siegel, R.M. (2011). Progranulin Resolves Inflammation. *Science*, 332, 427-428.

22. Speeckaert, M.M., Speeckaert, R., Laute, M., Vanholder, R., Delanghe, J. (2012). Tumor Necrosis Factor Receptors: Biology and Therapeutic Potential in Kidney Diseases. *Am J Nephrol*, 35, 261-270.

23. Jain, R.G., Phelps, K.D., Pekala, P.H. (1999). Tumor Necrosis Factor-Alpha Initiated Signal Transduction in 3T3-L1 Adipocytes. *J Cell Physiol*, 179, 58-66.

24. Moller, D.E. (2000). Potential Role of TNF- $\alpha$  in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *TEM*, 11, 6.

25. Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M. (1996). IRS-1 – Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- $\alpha$  - and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Science*, 271, 665-668.

26. Kanety, H., Feinstein, R., Papal, M.Z., Hemi, R., Karasik, A. (1995). Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Phosphorilation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1). *J Biol Chem*, 270(40), 23780-23784.

27. Corbould, A., Kim, Y.B., Youngren, J.F., Pender, C., Kahn, B.B., Lee, A., Dunaif, A. (2005). Insulin Resistance in The Skeletal Muscle of Women with PCOS Involves Intrinsic and Acquired Defects in Insulin Signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E1047–E1054.

28. Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P., Spiegelman, B.M. (1996). Inhibition of Adipogenesis Through MAP Kinase-Mediated Phosphorylation of PPAR-gamma. *Science*, 274, 2100-2103.
29. Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K. (1997). Transcriptional Activation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma is Inhibited by Phosphorylation at a Consensus Mitogen-Activated Protein Kinase Site. *J Biol Chem*, 272, 5128-5132.
30. Sung, C.K., She, H., Xiong, S., Tsukamoto, H. (2004). Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibits Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Activity at a Posttranslational Level in Hepatic Stellate Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286, G722-G729.
31. Serrero, G. (2003). Autocrine Growth Factor Revisited, PC-Cell-Derived Growth Factor (Progranulin), A Critical Player in Breast Cancer Tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 308, 409-413.
32. Bateman, A., Bennet, H.P.J. (2009). The Granulin Gene Family: From Cancer to Dementia. *BioEssays*, 31, 1245-1254.
33. Youn, B.S., Bang, S., Klötting, N., Park, J.W., Lee, N., Oh, J.E., Pi, K.B., Lee, T.H., Ruschke, K., Fasshauer, M., Stumvoll, M., Blüher, M. (2009). Serum Progranulin Concentrations May Be Associated with Macrophage Infiltration into Omental Adipose Tissue. *Diabetes*, 58, 627-636.
34. Gonzalez, F., Minium, J., Rote, N.S., Kirwan, J.P. (2005). Hyperglycemia Alters Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Release from Mononuclear Cells in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(9), 5336-5342.
35. Tang, W., Lu, Y., Tian Q.Y., Zhang, Y., Guo, F.J., Liu, G.Y., Syed, N.M., Lai, Y., Lin, E.A., Li, K., Su, J., Yin, F., Ding, A.H., Zanin-Zhorov, A., Dustin, M.L., Tao, J., Craft, J., Yin, Z., Feng, J.Q., Abramson, S.B., Yu, X.P. Liu, C. (2011). The Growth Factor Progranulin Binds to Tnf Receptors and is Therapeutic Against Inflammatory Arthritis in Mice. *Science*, 332, 478-484.
36. Kessenbrock, K., Fröhlich, L., Sixt, M., Lammerman, T., Pfister, A., Bateman, A., Belaouaj, A., Ring, J., Ollert, M., Fassler, R., Jenne, D.E. (2008).

Proteinase 3 and Neutrophil Elastase Enhance Inflammation in Mice by Inactivating Antiinflammatory Progranulin. *J Clin Invest*, 118(7), 2438-2447.

37. Tolkathev, D., Malik, S., Vinogradova, A., Wang, P., Chen, Z., Xu, P., Bennet, H.P.J., Bateman, A. (2008). Structure Dissection of Human Progranulin identifies Well-Folded Granulin/Epithelin Modules with Unique Functional Activities. *Protein Sci*, 17, 711-724.

38. Lu, R., Serrero, G. (1999). Stimulation of PC Cell-Derived Growth Factor (Epithelin/Granulin Precursor) Expression by Estradiol in Human Breast Cancer Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 204-207.

39. Daniel, R., He Z., Carmichael, K.P., Halper, J., Bateman, A. (2000). Cellular Localisation of Gene Expression for Progranulin. *J Histochem Cytochem*, 48, 999.

40. Favoni, R.E., De Cupis, A. (2000). The Role of Polypeptide Growth Factors in Human Carcinomas: New Target for a Novel Pharmacological Approach. *Pharmacol Rev*, 52, 179-206.

41. Qin, J., Diaz-Cueto, L., Schwarze, J.E., Takahashi, Y., Imai, M., Isuzugawa, K., Yamamoto, S., Chang, K.T., Gerton, G.L., Imakawa, K. (2005). Effects of Progranulin on Blastocyst Hatching and Subsequent Adhesion and Outgrowth in The Mouse. *Biol Reprod*, 73, 434-442.

42. Desmarais, J., Cao, M., Bateman, A., Murphy, B.D. (2008). Spatiotemporal Expression Pattern of Progranulin in Embryo Implantation and Placenta Formation Suggests a Role in Cell Proliferation, Remodeling and Angiogenesis. *Reproduction*, 136, 247-257.

43. He, Z., Bateman, A. (1999). Progranulin Gene Expression Regulates Epithelial Cell Growth and Promotes Tumor Growth *in vivo*. *Cancer Res*, 59, 3222-3229.

44. Li, L., Huang, H., Ping, J., Wang, X., Zhong, J., Dai, L. (2011). Clinicopathologic and Prognostic Implications of Progranulin in Breast Carcinoma. *Chinese Med J*, 124(13), 2045-2050.



45. Swamydas, M., Nguyen, D., Allen, L.D., Eddy, J., Dreau, D. (2011). Progranulin Stimulated by LPA Promotes The Migration of Aggressive Breast Cancer Cells. *Cell Commun Adhesion*, 18, 119-131.
46. Slegers, K., Brouwers, N., Van Damme, P., Engelborghs, S., Gijssels, I., Zee, J., Peeters, K., Mattheijssens, M., Cruts, M., Vandenberghe, R., De Deyn, P.P., Robberecht, W., Van Broeckhoven, C. (2009). Serum Biomarker for Progranulin-Associated Frontotemporal Lobar degeneration. *Ann Neurol*, 65, 603-609.
47. Kojima, Y., Ono, K., Inoue, K., Takagi, Y., Kikuta, K., Nishimura, M., Yoshida, Y., Nakashima, Y., Matsumae, H., Furukawa, Y., Mikuni, N., Nobuyoshi, M., Kimura, T., Kita, T., Tanaka, M. (2009). Progranulin Expression in Advanced Human Atherosclerotic Plaque. *Atherosclerosis*, 206, 102-108.
48. Kessenbrock, K., Dau, T., Jenne, D.E. (2011). Tailor-Made Inflammation: How Neutrophil Serine Proteases Modulate The Inflammatory Response. *J Mol Med*, 89, 23-28.
49. Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G.S., Wahl, S.M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C.D., Ding, A. (2002). Conversion of Proepithelin to Epithelins: Roles of SLPI and Elastase in Host Defence and Wound Repair. *Cell*, 111, 867-878.
50. Okura, H., Yamashita, S., Ohama, T., Saga, A., Yamamoto-Kakuta, A., Hamada, Y., Sougawa, N., Ohyama, R., Sawa, Y., Matsuyama, A. (2010). HDL/Apolipoprotein A-I Binds to Macrophage-Derived Progranulin and Suppresses Its Conversion into Proinflammatory Granulins. *J Atheroscler Thromb*, 17, 568-577.
51. Tönjes, A., Fasshauer, M., Kratzsch, J., Stumvoll, M., Blüher, M. (2010). Adipokine Pattern in Subjects with Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance in Comparison to Normal Glucose Tolerance and Diabetes. *PLoS ONE*, 5(11), e13911.
52. Matsubara, T., Mita, A., Minami, K., Hosooka, T., Kitazawa, S., Takahashi, K., Tamori, Y., Yokoi, N., Watanabe, M., Matsuo, E., Nishimura, O., Seino, S. (2012). PGRN is a Key Adipokine Mediating High Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity Through IL-6 in Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 15, 38-50.

53. Murri, M., Luque-Ramirez, M., Insenser, M., Ojeda-Ojeda, M., Escobar-Morreale, H.F. (2013). Circulating Markers of Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum Reproduc Update*, 0(0), 1-21, (2013).
54. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
55. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M. (2006). Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biol Interact*, 160, 1-40.
56. Erel, O. (2005). A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clin Biochem*, 38, 103-111.
57. Erel, O. (2004). A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin Biochem*, 37, 277-285.
58. Fenkci, V., Fenkci, S., Yilmazer, M., Serteser, M. (2003). Decreased Total Antioxidant Status and Increased Oxidative Stress in Women with Polycystic Ovary Syndrome May Contribute to The Risk of Cardiovascular Disease. *Fertil Steri*, 80(1), 123-127.
59. Gonzalez, F., Rote, N.S., Minium, J., Kirwan, P. (2006). Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stres in The Development of Insulin Resistance and Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome. *JCEM*, 91(1), 336-340.
60. Victor, V.M., Rocha, M., Banuls, C., Alvarez, A., Pablo, C., Sanchez-Serrano, M., Gomez, M., Hernandez-Mijares, A. (2011). Induction of Oxidative Stress and Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions in Polycystic Ovary Syndrome Patients with Insulin Resistance. *JCEM*, 96(10), 1-8.
61. Huerta-Garcia, E., Ventura-Gallegos, J.L., Victoriano, M.E.C., Montiel-Davalos, A, Tinoco-Jaramillo, G., Lopez-Marure, R. (2012). Dehydroepiandrosteron Inhibits The Activation and Dysfunction of Endothelial Cells by High Glucose Concentration. *Steroids*, 77, 233-240.

62. Aldriche W.N. (1953). An Enzyme Hydrolysing Diethyl p-Nitrophenyl Phosphate (E600) and Its Identity with The A-Esterase of Mammalian Sera. *Biochem J*, 53(1), 117-124.
63. Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D.M., Lusic, A.J., Navab, M., Fogelman, A.M. (2001). Human Paraoxonase-3 is an HDL-Associated Enzyme With Biological Activity Similar to Paraoxonase-1 Protein But is not Regulated by Oxidized Lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 542-547.
64. Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Reddy, S.T. (2001). Paraoxonase-2 is a Ubiquitously Expressed Protein with Antioxidant Properties and is Capable of Preventing Cell-Mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. *J Biol Chem*, 276(48), 44444-44449.
65. Durrington, P. N., Mackness, B., Mackness, M. I. (2001). Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 473-480.
66. Jarvik, G.P., Tsai, N.T., McKinstry, L.A., Wani, R., Brophy, V.H., Richter, R.J., Schellenberg, G.D., Heagerty, P.J., Hatsukami, T.S., Furlong, C.E. (2002). Vitamin C and E Intake is Associated with Increased Paraoxonase Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1329-1333.
67. Sutherland, W.H.F., Walker, R.J., De Jong, S.A., Van Rij, A.M., Phillips, V., Walker, H.L. (1999). Reduced Postprandial Serum Paraoxonase Activity After a Meal Rich in Used Cooking Fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1340-1347.
68. Draganov, D.I., La, Du B.N. (2004). Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 78-88.
69. Cabana, V.G., Reardon, C.A., Feng, N., Neath, S., Lukens, J., Getz, G.S. (2003). Serum Paraoxonase: Effect of The Apolipoprotein Composition of HDL and The Acute Phase Response. *J Lipid Res*, 44, 780-792.
70. Abbott, C.A., Mackness, M.I., Kumar, S., Boulton, A.J., Durrington, P.N. (1995). Serum Paraoxonase Activity, Concentration, and Phenotype Distribution in

Diabetes Mellitus and Its Relationship to Serum Lipids and Lipoproteins. *Arterio Thromb and Vasc Biol*, 15, 1812-1818.

71. Morris, P.D., Malkin, C.J., Channer K.S., Johnes, T.Hn. (2004). A Mathematical Comparison of Techniques to Predict Biologically Available Testosterone In A Cohort of 1072 Men. *Eur J Endocrinol*, 151, 241-249.

72. Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, L.M., Masson, P., Lockridge, O. (1999). Identification of Residues Essential for Human Paraoxonase (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities. *Biochemistry*, 38, 2816-2825.

73. Bayrak, T. (2009) *Tavşan Karaciğer Paraoksanaz 1 Enziminin Saflaştırılarak Kinetik Özellikleri, Endojen Substratları ve Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması*, (Doktora tezi), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi.

74. Kosaka, T., Yamaguchi, M., Motomura, T., Mizuno, K. (2005). Investigation of The Relationship Between Atherosclerosis and Paraoxonase or Homocysteine Thiolactonase Activity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Using a Commercially Available Assay. *Clin Chim Acta*, 359, 156-162.

75. Burghen, G.A., Givens, J.R., Kitabchi, A.E. (1980). Correlation of Hyperandrogenism with Hyperinsulinism in Polycystic Ovarian Disease. *J Clin Endocrin Metab*, 50, 1, 113-116, (1980).

76. Bergh, C., Carlsson, B., Olsson, J.H., Selleskog, U., Hillensjo, T. (1993). Regulation of Androgen Production in Cultured Human Thecal Cells by Insulin-Like Growth Factor I and Insulin. *Fertil Steril*, 59, 323-331.

77. Cara, J.F., Fan, J., Azzarello, J., Rosenfield, R.L. (1990). Insulin Like Growth Factor-1 Enhances Luteinizing Hormone Binding to Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells. *J Clin Invest*, 86, 560-565.

78. Gonzalez, F., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Prabhala, A., Tomani, M., Dandona, P. (1999). Elevated Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha in Normal-Weight Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Metabolism*, 48, 437-441.

79. Gonzalez, F., Rote, N.S., Minium, J., Kirwan, J.P. (2006). *In vitro* Evidence That Hyperglycemia Stimulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Release in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Endocrinol*, 188, 521-529.

80. Tarkun, I., Çetinarslan, B., Türemen, E., Cantürk, Z., Biyikli, M. (2006). Association Between Circulating Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6, and Insulin Resistance in Normal-Weight Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*, 4, 2, 122-8.
81. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M. (1993). Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor-alpha: Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
82. Klöting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., Schön, M.R., Kern, M., Stumvoll, M., Blüher, M. (2010). Insulin - Sensitive Obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299, E506-E515.
83. Puder, J.J., Varga, S., Kraenzlin, M., De Geyter, C., Keler, U., Müller, B. (2005). Central Fat Excess in Polycystic Ovary Syndrome: Relation to Low-Grade Inflammation and Insulin Resistance. *JCEM*, 90(11), 6014-6021.
84. Virtue, S., Vidal-Puig, A. (2008). It's Not How Fat You Are, It's What You Do With It That Counts. *PLoS Biol*, 6(9), 1819-1823.
85. Virtue, S., Vidal-Puig, A. (2010). Adipose Tissue Expandability, Lipotoxicity and The Metabolic Syndrome – An Allostatic Perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 338-349.
86. Fenkci, I.V., Serteser, M., Fenkci, S., Kose, S. (2007). Paraoxonase Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Reprod Med*, 52, 10, 879-83.
87. Dursun, P., Demirtaş, E., Bayrak, A., Yarali, H. (2006). Decreased Serum Paraoxonase 1 (PON1) Activity: An Additional Risk Factor for Atherosclerotic Heart Disease in Patient with PCOS? *Hum Reproduct*, 21, 1, 104-108.
88. Bayrak, T., Dursun, P., Bayrak, A., Gültekin, M., Kulusarı, A., Çakır, E., Ozyurt, M., Zeyneloğlu, H.B. (2012). Paraoxonase Lactonase Activity (PON-HTLase), Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase (PAF-AH) Activity in Non-Obese Women with PCOS. *Gynecol Endocrinol*, 1-5.

89. Wang, L., Hao, Q., Wang, Y.D., Wang, W.J., Li, D.J. (2011) Protective Effects of Dehydroepiandrosterone on Atherosclerosis in Ovariectomized Rabbits via Alleviating Inflammatory Injury in Endothelial Cells. *Atherosclerosis*, 214, 1, 47-57.