

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA EKZOSİTOZ İLİŞKİLİ SNARE
MOLEKÜLLERİNİN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE İN-VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Süleyman EROL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROMUNDA EKZOSİTOZ İLİŞKİLİ SNARE
MOLEKÜLLERİNİN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE İN-VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Süleyman EROL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sevda Fatma MÜFTÜOĞLU

ANKARA

2021

TEŞEKKÜR

Tez çalışması ve uzmanlık eğitimim sürecinde ilgili araştırma ortamını sağlayan, öğreten ve bilimsel desteğini sunan; uzmanlık eğitimim süresince entelektüel ve bilimsel zeminimi geliştirmemi destekleyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu'na,

Çalışmama klinik destek sağlayan ve uzmanlık eğitimimde bilim öğreticiliğini hiç esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer'e,

Tüm destekleri için Sayın Prof. Dr. Figen Kaymaz'a

Bana çalışma yapabilecek bilimsel vizyonu, beceri ve yetkinlikleri sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ve tüm öğretim üyelerine,

Histoloji ve Embriyoloji bilimine adım attığım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve öğretim üyelerine,

Tez çalışmamda hem laboratuvar altyapısı hem de malzeme temini için gerekli desteği sağlayan, eğitimimi aldığım Hacettepe Üniversitesi'ne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Gelişimim ve becerilerimde büyük emeği olan kıymetli kıdemlim Dr. Selim Zırh'a,

Berber yetiştirdiğimiz kıymetli araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Deniz Ekin Doğan'a, Dr. Kübra Simay Aydın Akkurt'a ve Dr. Sefa Burak Çam'a

Tez sürecimde kahrımı çeken ve bütün desteğini sunan sevgili eşim Uzm. Mol. Bio. Gökçe Nur Arık Erol'a,

Her açıdan her zaman desteğini sunan kıymetli abim Doç. Dr. Enver Ahmet Demir'e

Bugünlere gelmemi sağlayan, bana bilim felsefesini ve bilimsel düşünceyi öğreten şekillendiren sevgili babam Abdurrahman Erol'a ve babaanneme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Süleyman Erol, Polikistik Over Sendromunda Ekzositoz İlişkili SNARE Moleküllerinin Granüloza Hücrelerinde İn-Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021. Polikistik over sendromu üreme çağındaki kadınlarda kronik anovulasyonun en sık nedeni olması ve üremeye yardımcı tedavi ihtiyacı doğurması nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. Membrana granülozayı oluşturan granüloza hücrelerinin sentez yeteneğindeki bozulma veya ekzositoz yeteneğindeki bozulma folikül içi sinyal molekülü miktarındaki disregülasyondan sorumlu olabilir. Bu amaçla ÜYTE kliniğine başvuran çiftlerin erkek faktörü (n=10) ve PKOS (n=10) kadınlarından oosit toplama işlemi sonrası atılan granüloza hücrelerinde “vezikül füzyon proteinleri”nden olan Stx6, SNAP25 ve StxBP1 proteinleri immunofloresan işaretleme yöntemi ile araştırılmış ve elektron mikroskopik inceleme yapılmıştır. Polikistik over sendromunda Stx6, SNAP25 ile StxBP1 düzeyinin azaldığı ve in-vitro ortamda FSH-hCG uyarısı ile bozulmanın düzelmediği görülmüştür. Granüloza hücrelerinin salgıladığı KITL faktörünün de hücre içinde azalmıştır. Elektron mikroskopik incelemede PKOS'ta granüloza hücrelerinin veziküllerinde elektron yoğunluğunun sağlıklı bireylerine göre azalmıştır. Bu çalışmanın sonucunda PKOS'ta, sağlıklı granüloza hücrelerine göre; vezikül miktarının azaldığı, FSH-hCG uyarısına verilen veziküler yanıt bozulmuş ve Stx6, SNAP25, StxBP1 düzeyleri azalmıştır. Sonuç olarak PKOS'ta bozulmuş olan granüloza hücresi kökenli faktörlerin sentezindeki aksaklığın yanında salgılanmasında da bozulma olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Polikistik over sendromu, granüloza hücresi, Stx6, SNAP25, StxBP1, KITL, Elektron mikroskopi, immünfloresan inceleme.

Destekleyen kuruluş: Bu uzmanlık tezi Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSA-2019-18196 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Erol, S. In-Vitro Evaluation of Exocytosis Related SNARE Molecules in Granulosa Cells of Polycystic Ovary Syndrome, Hacettepe University Faculty of Medicine, Histology and Embryology Specialty Thesis, Ankara, 2021. Polycystic ovary syndrome is the most common cause of chronic anovulation in women of reproductive age and may require assisted reproductive treatment. Dysregulation of intra-follicular growth factors and other signal molecules has been determined in studies for polycystic ovary syndrome. As a result of the disruption of the intra-follicular environment, folliculogenesis breaks down and oligo/anovulation occurs. The impairment of synthesis or exocytosis in the membrane granulosa cells may be responsible for dysregulation in the amount of intra-follicular signaling molecule. In this thesis, the expression level of Stx6, SNAP 25, and StxBP1 proteins, which are the vesicle fusion proteins, of granulosa cells in PCOS were investigated in comparison to healthy women. For this purpose, granulosa cells of follicle fluid were isolated who PCOS (n=10) and male factor (n=10) infertility patient, then immunofluorescence labeling method was used. Also, human granulosa cells were proliferated in-vitro then examined by electron microscopy for intracellular vesicles. It has been shown that Stx6, SNAP 25, and StxBP1 levels are decreased in PCOS. It was observed that the KITL secreted by granulosa cells decreased in the cell in the PCOS. Electron density of the vesicles decreased in granulosa cells. According to our results, granulosa cells in PCOS compared to healthy granulosa cells; it was demonstrated that the number of vesicles decreased, vesicular response to FSH-hCG stimulation was impaired, and Stx6, SNAP25, StxBP1 levels decreased. As a result, it has been revealed that there is a disruption in the secretion of granulosa cell-derived factors, which are impaired in PCOS, as well as in the synthesis.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, granulosa cell, Stx6, SNAP 25, StxBP1, KITL, Electron microscopy, immunofluorescence labeling.

This research was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit under project TSA-2019-18196.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Polikistik Over Sendromunun Tarihçesi	6
2.2. Ovaryum	8
2.2.1. Ovaryum Korteksi	9
2.2.2. Ovaryum Folikülleri	9
2.2.3. Ovaryum Medullası	12
2.3. Kan Folikül Bariyeri	12
2.4. Folikülogenez	13
2.5. Folikül İçi Mikroçevre ve Hücrelerarası Etkileşim	16
2.6. Polikistik Over Sendromu (PKOS)	17
2.6.1. PKOS'un Klinik Bulguları	18
2.6.2. PKOS'un Patofizyolojisi	19
2.7. Vezikül Füzyonu Hipotezi ve Vezikül Dinamiği	20
2.8. İnsan Ovaryumunda Vezikül Dinamiğinin Rolü	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Etik Kurul İzin Süreci	28
3.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi	28
3.3. Folikül Sıvısının Temini	29
3.4. Folikül Sıvısından ve Denüstasyon Artığından Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu ..	30
3.5. HGL5 ve Primer Granüloza Hücrelerinin Ekilmesi ve Çoğaltılması	31
3.6. Kültür Hücrelerinin Kaldırılması, Pasajlanması ve Dondurulması	32
3.7. Kültür Hücrelerinin Sayılması	33

3.8. Uyarma Besiyerinin Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması	34
3.9. İmmünfloresan İşaretleme için Gerekli Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması	35
3.9.1. Fosfat tamponu (PBS):	35
3.9.2. PBS-BSA solüsyonu hazırlanması:	36
3.9.3 Serum blokajı solüsyonu:	36
3.9.4. Primer antikolar:	36
3.9.5. Floresan işaretli sekonder antikor:	37
3.10. İmmünfloresan İşaretlemenin Uygulanması	39
3.11. Elektron Mikroskopik İncelemenin Uygulanması	40
3.11.1. Elektron Mikroskopi için Hücrelerin Tespiti	40
3.11.2. Hücre Peletinin Agara Gömülmesi	41
3.11.3. Örneklerin Elektron Mikroskopi için Takibi	41
3.11.4. Örneklerin Araldite Gömülmesi	42
3.11.5. Hücre Bloklarından Kesit Alınması	42
3.11.6. Kesitlere Boyamanın Uygulanması	43
3.11.7. Kesitlerin Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskopunda İncelenmesi ve Görüntülenmesi	43
3.12. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Katılımcıların Demografik Özellikleri	45
4.2. Kültüre Edilen Hücrelerin Faz Kontrast Mikroskopunda İncelenmesi	46
4.3. İmmünfloresan İşaretlemenin Değerlendirilmesi	52
4.3.1. FSHr İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi	52
4.3.2. Stx6 İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi	55
4.3.3. SNAP25 İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi	59
4.3.4 StxBP1 İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi	62
4.3.5 KITL İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi	65
4.3.6. HGL5 Hücre Hattında FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL İmmünfloresan İfadesinin Değerlendirilmesi	69
4.4. Kontrol (Sağlıklı, Erkek Faktörü) ve PKOS Grubu Granüloza Hücrelerinin Elektron Mikroskopunda İncelenmesi	73
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
7. KAYNAKLAR	85

KISALTMALAR

PKOS	: Polikistik Over Sendromu
ÜYTE	: Üremeye Yardımcı Tedaviler
NIH	: Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
NICHD	: Amerikan Ulusal Çocuk ve İnsan Gelişimi Enstitüsü
ESHRE	: Avrupa Üreme Sağlığı ve Embriyoloji Derneği
ASRM	: Amerikan Üreme Tıbbi Derneği
PGH	: Primordial Germ Hücresi
DER	: Düz Yüzlü Endoplazma Retikulumu
GER	: Granüllü Endoplazma Retikulumu
KFB	: Kan Folikül Bariyeri
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
FSHr	: Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörü
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropini
LH	: Lüteinize Edici Hormon
cKit	: Tirozin Kinaz Reseptörü
KITL	: Kit Ligandı
Lig.	: Ligamentum
GDF9	: Büyümeyi Farklandırıcı Faktör 9
AMH	: Anti Mülleriye Hormon
SDF1	: Stroma Kökenli Faktör-1
CXCR4	: Kemokin Reseptörü-4
TZPs	: Trans-zonal Uzantılar
TGFβ	: Transforme Edici Büyüme Faktörü β
BMPs	: Kemik Morfogenetik Proteinleri
GDFs	: Büyüme Farklılaşma Faktörleri
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

Ca²⁺	: Kalsiyum İyonu
GLUT4	: Glukoz Taşıyıcı tip-4
GPI	: Glikofosatidilinozitol
VGEF	: Vasküler Endotelyal Faktör
HGL5	: İnsan Granüloza Hücre Hattı 5
PBS	: Fosfatlı Tampon Solüsyonu
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
°C	: Santigrad Derece
NSF	: N-etilmaleimid Duyarlı Füzyon Proteini
SNAP	: Sinaptozom İlişkili Protein
SNARE	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNAP reseptörü)
α-SNAP	: Sinaptozom İlişkili Protein α
SNAP25	: Sinaptozom İlişkili Protein 25
StxBP1	: Sintaksin Bağlayıcı Protein 1
Stx6	: Sintaksin 6
ZP1	: Zona pellusida sperm bağlayıcı proteini-1
ZP2	: Zona pellusida sperm bağlayıcı proteini-2
ZP3	: Zona pellusida sperm bağlayıcı proteini-3
ZP4	: Zona pellusida sperm bağlayıcı proteini-4

ŞEKİLLER

- Şekil 1:** Vezikül füzyonunun sadeleştirilmiş şeması. (BioRender programı kullanılarak çizilmiştir)..... 4
- Şekil 2:** Üreme çağındaki kadının menstrüel siklusunun şeması. Menstrüel siklus üzerinde normal folikül gelişimi kronobiyolojik olarak gösterilmiştir. (Bu şekil tarafımda çizilmiştir) . 16
- Şekil 3:** SNARE proteinleri aracılı membran füzyonuna nörotransmitter salınımı örnektir. A, v-SNARE olarak sinaptobrevin (mavi) taşıyan bir vezikül plazma membranına yaklaşmakta. Plazma membranında t-SNARE olarak sintaksin (kırmızı) ve SNAP-25 (yeşil) görülmektedir. B, v-SNARE ve t-SNARE bağlanarak inaktif kompleks oluşturur. C, Uyarı geldiğinde trans-SNARE kompleksi aktifleşir ve membranları yaklaştırır. D, Membranlar kaynaşır ve cis-SNARE kompleksi membranda kalır. E, SNARE aracılı vezikül füzyonuna yakından bakış. (Cell Biology, Thomas D. Pollard, 3. Baskı 2017, Elsevier'ın 4999460954678 numaralı izniyle kullanılmıştır.) 22
- Şekil 4:** Santrifüj tüpünde bulutsu fazın görülmesi..... 31
- Şekil 5:** Hücrelerin pasajlanması. 33
- Şekil 6:** Kaldırılmış hücrelerin hemasitometre lamında sayılması. 34
- Şekil 7:** Antikorlar için farklı antikor dilüsyonlarının belirlenmesi. A, FSHr işaretlemesi x40 büyütme, 1/100 primer antikor 1/500 sekonder antikor dilüsyonu. B, Stx6 işaretlemesi x40 büyütme, primer antikor 1/200, sekonder antikor 1/800 dilüsyonda. C, Stx6 işaretlemesi x40 büyütme, 1/100 primer antikor, 1/1000 sekonder antikor dilüsyonu. D, FSHr işaretlemesi x40 büyütme, 1/100 primer antikor, 1/1000 sekonder antikor dilüsyonu. E, sadece DAPI ile işaretlenmiş kontrol, x40 büyütme. F, primer antikorsuz kontrol, x40 büyütme. (Olympus IX73 floresan mikroskop, Olympus U-RFL-T ışık kaynağı, Japonya) 38
- Şekil 8:** Primer antikoların 8 kuyucuklu lamdaki yerleri. 40
- Şekil 9:** İnsan folikül sıvısından primer granüloza hücrelerinin izolasyon süreci. **A:** İzolasyon öncesi folikül sıvısının faz kontrast mikrografi. Beyaz ok granüloza hücresi kümesini, beyaz yıldız ise eritrositleri ve diğer kan hücrelerini göstermektedir. **B:** İzolasyon sonrası granüloza hücrelerinin faz kontrast mikrografi, zeminde kan hücreleri görülmemektedir. **C:** İzolasyon sonrası 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilen tutunmuş granüloza hücrelerinin 48. Saatteki faz kontrast mikrografi. (Mikrograflar x20 objektif büyütmesinde çekilmiştir.)..... 47
- Şekil 10:** Primer granüloza hücre kültürünün faz kontrast mikrografları. **A:** Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Henüz tutunmadıkları görülmektedir. **B:** Primer kültürde 8. saat

granüloza hücreleri. **C:** Primer kültürde 72. saat granüloza hücreleri. **D:** Primer kültürde 2. hafta granüloza hücreleri. **E:** Primer kültürde küme şeklinde tutunan granüloza hücrelerinin 24. saat mikrografları. **F:** Primer kültürde küme şeklinde tutunan granüloza hücrelerinin 72. saat mikrografları. Granüloza hücresi kümesinden çevreye doğru çoğalarak yayılan hücreler görülmektedir. 48

Şekil 11: Sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde primer kültür mikrografları. Gruptaki farklı bireylerden çekilmiş faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Kültür hücrelerinin morfolojileri homojen özellik göstermektedir. Hücreler uzantıları ile temas kurma eğilimi göstermiştir. 50

Şekil 12: PKOS tanısı alan kadınların granüloza hücrelerinde primer kültür mikrografları. Gruptaki farklı bireylerden çekilmiş faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Hücreler morfolojik olarak homojen özellik göstermektedir. Hücrelerin sitoplazmik uzantıları ile temas kurma eğilimi bulunduğu ve birbirleri ile birçok noktada kontakt kurdukları izlendi. 51

Şekil 13: HGL5 insan granüloza hücre hattı hücrelerinin faz kontrast mikroskobunda çekilmiş mikrografları. **A:** HGL5 hücreleri 8. saat mikrografı. **B:** HGL5 hücreleri 24. saat mikrografı. **C:** HGL5 hücreleri 48. saat mikrografı. 52

Şekil 14: Granüloza hücrelerinde FSHr immünfloresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. 53

Şekil 15: Granüloza hücrelerinde Stx6 immün floresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. 56

Şekil 16: Granüloza hücrelerinde SNAP25 immünfloresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. 60

Şekil 17: Granüloza hücrelerinde StxBP1 immünfloresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. 63

Şekil 18: Granüloza hücrelerinde KITL immünfloresan işaretlemesi. Oklar kümelenmiş KITL işaretlenmesini göstermektedir. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:**

Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. 66

Şekil 19: HGL5 hücrelerinde FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL'nin immünfloresan işaretlemeleri. X40 objektif büyütmesi..... 71

Şekil 20: Sağlıklı (kontrol) kadınlardan alınan granüloza hücrelerinin in vitro kültürü sonrasında elektron mikrografları. Kalın beyaz oklar elektron dansitesi yüksek vezikülleri, beyaz yıldızlar lipid damlacıklarını, ince beyaz oklar çekirdeği, siyah oklar boş veya kısmen boş vezikülleri göstermektedir. (A, B ve D mikrografları X20.000; C, E ve F mikrografları X8.000) 75

Şekil 21: PKOS'lu kadınlardan alınan granüloza hücrelerinin in vitro kültürü sonrasındaki elektron mikrografları. Uyarılmış koşullarda varlığı devam eden elektron dansitesi yüksek veziküller görülmekte. Uyarılmamış koşullarda sitoplazmanın vezikül içeriği kontrol grubuna göre azalmış izlenmekte. Kalın beyaz oklar elektron dansitesi yüksek vezikülleri, ince beyaz oklar çekirdeği, siyah oklar boş veya kısmen boş vezikülleri göstermektedir. (A, B, C ve D mikrografları 12.000 büyütme; E ve F mikrografları 6.000 büyütmede çekilmiştir.)..... 76

TABLULAR

Tablo 1: Polikistik over sendromunun 2003 yılında uzlaşılan Rotterdam kriterleri.	1
Tablo 2: Polikistik over sendromunun 2003 yılında uzlaşılan Rotterdam kriterleri.	8
Tablo 3: NIH'in yaptığı panelde varılan uzlaş. HA: klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm, OA: oligo-anovulasyon, PKOM: polikistik over morfolojisi. *PKOM: Hacmi 10 cm ³ 'ten (veya 10mL) daha büyük olan en az bir ovaryum varlığı veya korteksinde artmış antral folikül sayısı veya her iki durumun da varlığı olarak tanımlanır. Antral foliküller 2-9 mm çapındadır ve tüm ovaryumda en az 12 adet bulunmalıdır ⁵⁹	18
Tablo 4: Deney gruplarının dağılımı.....	29
Tablo 5: Elektron mikroskopik inceleme için akış şeması.....	43
Tablo 6: PKOS ve kontrol grubu katılımcıların yaşlarına ilişkin sayısal veriler.	45
Tablo 7: PKOS ve kontrol grubu katılımcılarına ait yaşların kutu çizgi grafiği.....	46
Tablo 8: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde FSHr immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	54
Tablo 9: FSHr yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	55
Tablo 10: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde Stx6 immunfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	57
Tablo 11: Granüloza hücrelerinde ölçülen Stx6 immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri.....	58
Tablo 12: FSHr ve Stx6 floresan yoğunlukları arasındaki korelasyon grafiği.	59
Tablo 13: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde SNAP25 floresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	61
Tablo 14: Granüloza hücrelerinde ölçülen SNAP25 immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	62
Tablo 15: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde StxBP1 immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.....	64
Tablo 16: Granüloza hücrelerinde ölçülen StxBP1 immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	65
Tablo 17: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde KITL immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	67

Tablo 18: Granüloza hücrelerinde ölçülen KITL immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	68
Tablo 19: KITL ve Stx6 arasındaki korelasyon grafiği. Kontrol grubu korelasyon katsayısı 0,314 ($p<0,001$), PKOS grubu için korelasyon katsayısı 0,355 ($p<0,001$) (Spearman Korelasyon Testi)	69
Tablo 20: HGL5 hücre hattı hücrelerinde FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	72
Tablo 21: HGL5 hücre hattında FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.	73

1.GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınların %5-20'sini etkiler¹. Stein ve Leventhal tarafından ilk olarak 1935 yılında amenore ve hirsutizm bulguları olan kadınlarda tanımlanmıştır. Günümüzde anovulasyonu olan kadınların %55-91'i PKOS'dur². Ayrıca Üremeye Yardımcı Tedavi Kliniklerine (ÜYTE) başvuran kadın hastaların %20'sini PKOS'lu veya polikistik ovaryum morfolojisine sahip hastalar oluşturur³.

PKOS'a hiperinsülinemi tablosunun eşlik ettiğinin anlaşılmasıyla 1990 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'ü (National Institutes of Health- NIH) ve Amerikan Ulusal Çocuk ve İnsan Gelişimi Enstitüsü (National Institute of Child and Human Development- NICHD)'nün ortak konferansında PKOS; multifaktöriyel etiyojolojiye sahip endokrinopati olarak tanımlanmaya başlandı. Günümüzde kabul gören PKOS tanımı ve tanı kriterleri Avrupa Üreme Sağlığı ve Embriyoloji Derneği (European Society of Human Reproduction and Embryology- ESHRE) ile Amerikan Üreme Tıbbi Derneği (American Society of Reproductive Medicine- ASRM) tarafından yayınlanan Rotterdam kriterleridir^{1,2}. Rotterdam kriterlerine göre polikistik over sendromunda oligo/anovulasyon, klinik veya biyokimyasal olarak hiperandrojenizm bulguları, polikistik over görünümü kriterlerinden en az iki tanesi bulunmalıdır (Tablo 1). Ayrıca konjenital adrenal hiperplazi, androjen salgılayan tümörler, tiroid hastalıkları, Cushing sendromu gibi PKOS benzeri klinik durumlar dışlanmalıdır⁴.

Tablo 1: Polikistik over sendromunun 2003 yılında uzlaşılan Rotterdam kriterleri.

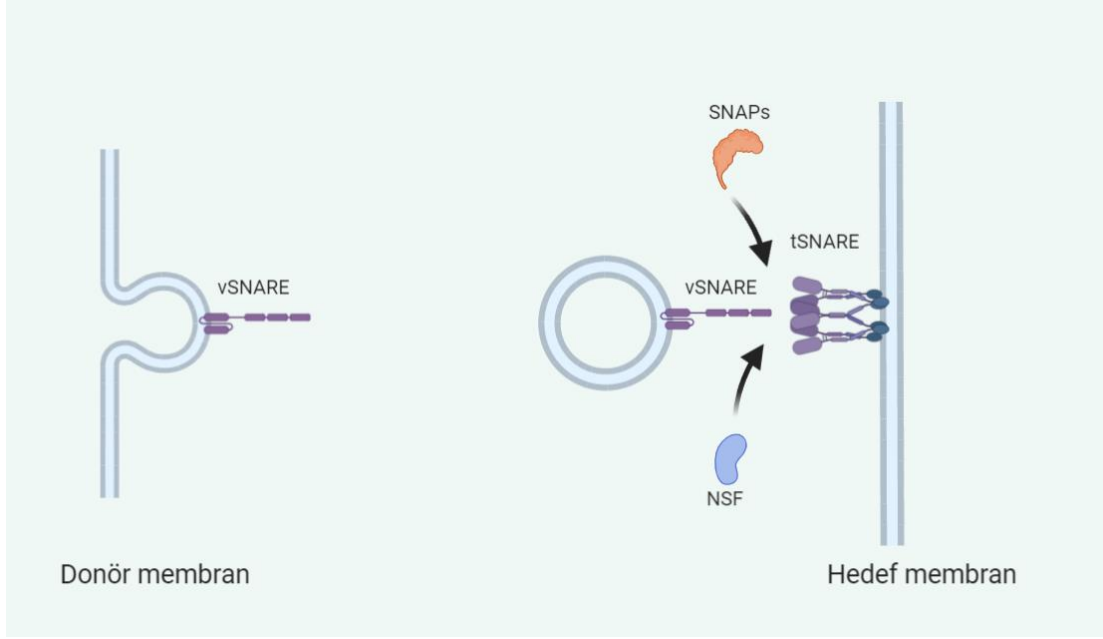
PKOS Rotterdam Kriterleri (2003)
1- Oligo/Anovulasyon
2- Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm
3- Polikistik overler
Üç kriterden en az ikisi olmalı. Diğer nedenler dışlanmalı.

PKOS bu özellikleri ile üreme çağındaki kadın infertilitesi ve subfertilitesinin en önemli sebebidir. Hastalığın patogeneğinde fertiliteyi ve metabolizmayı etkileyen anormal gonadotropin sentezi ve hiperinsülinemi sorumlu tutulmakla birlikte, folikül gelişiminde duraklama (antral folikül gelişiminin başarısız olması ve kistik formasyon) ve steroid sentezinde bozulma ana değişikliklerdir. Primordiyal folikülden Graaf folikülüne kadar süren folikülogenez dönemi yaklaşık altı ay sürer. Bu sürenin son iki haftası Graaf folikülü gelişimi ile karakterizedir. Folikülogenez süreci son iki haftaya kadar ovaryum ortamındaki lokal steroidler ve büyüme faktörleri ile düzenlenirken, folikülogenezin son iki haftasında gonadotropinlerin etkisi başlar. Preantral folikül evresine kadar lokal faktörler foliküllerin geleceğini belirler, foliküllerin birçoğu ilerleyemez ve çok azı Graaf folikülü evresine gelebilir⁵. Kan-folikül bariyeri değişen folikül evrelerine göre lokal büyüme faktörlerinin ve steroidlerin etkisini ve plazma kaynaklı faktörlerin geçirgenliğini düzenler. Özellikle folikül uyarıcı hormona (FSH) duyarlı folikül evrelerinde foliküler niş (folikül içi ortam, folikül mikroçevresi) folikülogenezin ana yönlendiricisidir^{6,7}. Böylece folikülün erken evrelerinde folikül ortamını granüloza hücrelerinin ve oositin yönetmesine imkân sağlanır⁸. Örneğin oositin salgıladığı büyümeyi farklandırıcı faktör 9 (growth differentiation factor 9, GDF9) normal folikülogenez için gereklidir. Granüloza hücreleri tarafından salgılanan kit ligandı (KITL) oosit üstündeki c-kit reseptörü aracılığıyla oositin sağ kalımını destekler. Ayrıca teka ve granüloza hücrelerinde steroidogenezi uyararak folikülogenezi indükler. Oosit GDF9 salgılayarak c-kit/KITL aksını yönetir⁹. GDF9 düzenlenmesinin bozulmasıyla folikülogenez bozulur ve PKOS'ta da GDF9 disregülasyonu mevcuttur¹. Granüloza hücrelerinden salgılanan anti mülleriye hormon (AMH) gestasyonel dönemin 25. haftasında primordiyal foliküllerde ifadelenmeye başlar ve ifadelenme menapoza kadar devam eder. Preantral ve küçük antral foliküllerde AMH ifadelenmesi en yüksek seviyeye ulaşır. Dominant folikülün seçilmesiyle Graaf folikülüne doğru ilerledikçe granüloza hücrelerindeki AMH ifadesi azalır. AMH primordiyal foliküllerin folikülogeneze erken girmelerini engelleyerek inhibitör rol oynar. Böylece prematür folikül ve oosit gelişiminin önüne geçilir. Ayrıca AMH folikülün FSH'ya olan duyarlılığını da azaltır. PKOS'ta intrafoliküler AMH

düzeyleri sağlıklı bireylere göre oldukça yüksek gözlenmiştir. AMH'nın yüksek düzeyleri folikül içi FSH duyarlılığını azaltarak folikülogenezi duraklatır (follicular arrest). FSH duyarlı folikül evrelerine ilerleyemeyen folikül, kistler oluşturur¹⁰. İntrafoliküler ortamda granüloza hücreleri ve oositin yaptığı bu haberleşme süreci (cross-talk), folikülogenez boyunca dominant folikülün seçiminde ve primordial folikülden primer foliküle ilerlemenin başlamasında rol oynar.

Ekzositoz, sitoplazma veziküllerinin üzerindeki ve plazma membranındaki füzyon proteinleri aracılığı ile vezikülün hücre zarıyla kaynaşması sonucu vezikül içeriğinin hücre dışına salgılanmasıdır¹¹. Folikülogenez ve ovulasyon boyunca granüloza hücreleri, oosit ile haberleşmek için ekzositoz yaparak birçok faktör salgılar¹².

Vezikül füzyonu hipotezi, NSF (NEM sensitive fusion) proteinleri, SNAP'ler (soluble NSF attachment proteins) ve SNARE (SNAP receptor) proteinlerinin görev aldığı süreçle işler. Hücre zarıyla kaynaşacak olan vezikül, üzerinde füzyon proteinlerini taşımaktadır. Bu protein vSNARE (vesicle SNARE) olarak adlandırılır. Plazma membranında bulunan tSNARE (target SNARE) ile karşılaştığında vezikülün plazma membranı ile füzyonu gerçekleşir ve vezikül içeriği hücre dışına çıkarılmış olur. SNARE molekülleri membrana bağlı integral proteinleridir. Sürecin düzenleyicileri olan SNAP ve NSF proteinleri sitoplazmada çözünebilir proteinlerdir¹³ (Şekil 1).



Şekil 1: Vezikül füzyonunun sadeleştirilmiş şeması. (BioRender programı kullanılarak çizilmiştir)

Farelerin gelişmekte olan foliküllerinde granüloza hücrelerinin SNAP25 ifadesi gonadotropin uyarısı ile artar^{12,14}. α -SNAP'ın homozigot mutasyonu bulunan dişi farelerde; ovulasyon oranlarında azalma, atretik folikül sayısında artma, östrus sürelerinde uzama ve düzensiz sikluslar gözlenmiştir. Ayrıca bu fareler belirgin şekilde subfertilite göstermektedir. Peripubertal dönemde kontrol grubuna göre α -SNAP mutasyonu olan grupta primer folikül sayısında artma gözlenirken, diğer tüm folikül evrelerindeki foliküllerin sayısında azalma oluşur. Homozigot α -SNAP mutasyonu olan farelerde antral ve Graaf folikülü sayısı belirgin olarak daha düşüktür. Bunların yanında mutant farelerde granüloza hücrelerinde apoptoz oranı da artar¹⁵. α -SNAP'ın farelerdeki homozigot mutasyonu ovaryum histolojisi ve bulguları açısından PKOS ile benzerlik gösterir. Munc18 (diğer adıyla StxBP1= Syntaxin Binding Protein 1) proteini SNAP25 etkileşimini sağlayan proteindir. SNARE'lerin buluşmasına ve vezikül füzyonunun sağlanmasına yardım eder. StxBP1 mutasyonunda sinapslardaki ekzositoz tamamen durur¹⁶. Stx6 (Syntaxin 6) proteini hücre zarı, endozom ve Golgi kompleksinde ifadelenen tSNARE proteindir¹⁷. Golgi içi vezikül trafiğinde, Golgi

kompleksinden vezikül çıkışında, vezikül tanınmasında ve vezikül füzyonunda görev almaktadır¹⁸. Stx6 anterograd vezikül taşınımında ve salgılamada, membran yeniden kazanımında (recycling) ve membran komponentlerinin hücre zarına hedeflenmesinde görev alır. Ayrıca endokrin fonksiyon gösteren hücrelerde immatür salgı veziküllerinin homotipik füzyonu da Stx6 aracılı gerçekleşir¹⁹. Ancak insan granüloza hücrelerinde Stx6, StxBP1 ve SNAP25'in ifadenmesi ve gonadotropin uyarısına verdiği yanıtla ilgili bilgi ve Stx6, StxBP1 ve SNAP25'in PKOS'taki yeri bilinmemektedir.

Bu çalışmada amacımız; PKOS tanılı ve sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinin çevresi ile etkileşimindeki değişimi çıkarsamak üzere, vezikül füzyon proteinlerinden SNAP25, StxBP1 ve Stx6 ifadelerindeki değişiklikleri incelemektir. Çalışmanın esas araştırma sorusu, Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE) laboratuvarında in-vitro fertilizasyon önerilmiş PKOS hastaları ile erkek infertilitesi nedeniyle başvurmuş sağlıklı kadınların kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde veziküler füzyonda ve/veya ekzositozda görev alan proteinlerin ifadesinde anlamlı değişim olup olmadığının araştırılmasıdır. Esas araştırma sorusunun yanı sıra PKOS'lu ve sağlıklı katılımcılardan elde edilen granüloza hücrelerinin FSH-hCG uyarısına verdikleri SNAP25, StxBP1, Stx6, KITL ve FSHr ifadelerindeki yanıtta araştırılacaktır. Sağlıklı ve PKOS'lu katılımcıların granüloza hücrelerinde in-vitro FSH-hCG uyarısı ile salgı veziküllerindeki değişimde elektron mikroskopu ile incelenecektir. PKOS tanısı almış ve sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde Stx6, StxBP1, SNAP25 ile KITL düzeyleri ve FSH'nın buna düzenleyici etkisinin ve PKOS'ta FSH-hCG uyarısı ile oluşan salgı vezikülü cevabının incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu hedef doğrultusunda oluşturduğumuz hipotezimiz; PKOS'ta folikül içi hücreler arası etkileşim, granüloza hücrelerindeki veziküler füzyon ve/veya ekzositozun değişimi ile bozulur.

Araştırma kapsamında vezikül füzyon proteinlerinden SNAP25, StxBP1 ve Stx6 incelenmiştir. FSH-hCG uyarısına verilen vezikül yanıtı elektron mikroskopik inceleme ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromunun Tarihçesi

Polikistik over sendromu (PKOS) ile ilgili ilk tanım 1721 yılında İtalyan Hekim Antonio Vallisneri tarafından yapılmıştır. Vallisneri evli ve çocuğu olmayan bir kadının ovaryumlarını incelemiş ve normalden daha büyük, güvercin yumurtasına benzer, parlak beyaz renkli ve yüzeyi pütürlü olarak tanımlamıştır (Giovane rustica maritata, moderatamente pingue ed infeconda, con due ovaie piu grandi del normale, come un uovo di colomba, bernoccolute, lucenti e biancastre.)²⁰. 1844 yılında Chereau ve Rokitansky ovaryumlarda dejeneratif değişikliklerin eşlik ettiği hidropik foliküller ve sklerotik lezyonlar tarif etmiştir. Bulius ve Kretschmar ilk defa hipertekozis bulgusunu tanımlamıştır. 1879 yılında Lawson Tait semptomatik kistik dejenerasyonu olan hastalarda ooferektomi yaptıktan sonra parsiyel ovaryum rezeksiyonu tedavide kabul gören yöntem olmuştur. 1915'te John A. McGlinn kistik ovaryumların yüzeyinde delikler açmanın (ovarian drilling) parsiyel ooferektomiden daha etkili olduğunu bulmuştur²¹. 1935 yılında Stein ve Leventhal 7 kadında yaptığı incelemede menstruasyon düzensizliliği, hirsütizm ve hidropik foliküller taşıyan büyük ovaryumların ortak olarak gözlendiği sendromu tanımlamıştır. Ayrıca bu hastalarda ovaryumdan kama rezeksiyonu yaptıklarında hastaların tamamında menstruasyon siklusunda düzelme gerçekleştiği, iki hastanın ise gebe kaldığı görülmüştür²².

PKOS, kadınlarda görülen maskülinizasyon olarak tanımlandıktan sonra araştırmacılar etiyojisi ve patogenezini açıklamak üzere araştırmalar yapmışlardır. Stein ve Leventhal puberteden itibaren menstrüel siklus hormonlarının uyarımında oluşan düzenlemenin bozulması sonucu maskülinizasyon ve bilateral polikistik ovaryumların oluştuğunu öne sürmüştür²³. 1950'lerde hirsütizm bulgusunu ön plana çıkaran araştırmacılar, adrenokortikal bezin hiperfonksiyonuna bağlı artan ketosteroidlerin androsteron artışı yapmasına bağlı maskülinizasyon oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Bu hipoteze dayanarak PKOS tedavisinde kortizol ile adrenal bezin baskılanması denenmiştir. Sonraları adrenal bezin baskılanmasıyla artan

adrenokortikotropik hormonun (ACTH) androjen sentezini artırdığı tespit edilmiştir²⁴. 1957 yılında Keettel ve arkadaşları folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinize edici hormon (LH)'un PKOS'un etiyolojisindeki rolünü araştırmıştır²⁵. 1970'lere gelindiğinde PKOS patogenezinde hipotalamo-hipofizer aksdaki pulsatil gonadotropinlerin disregülasyonu olduğu gösterilmiştir²⁶. 1980'lerde Swanson ve arkadaşlarının PKOS tanısında ultrasonografiyi kullanmasıyla²⁷ ve PKOS'lu hastaların ovulasyon indüksiyonunda klomifen sitratın kullanılmaya başlanmasıyla²⁸ PKOS tanı ve tedavisi invaziv tekniklerden uzaklaşmıştır. Bunların yanında PKOS'ta obeziteden bağımsız olarak insülin direncinin ve akantozis nigrikansın varlığı tespit edilmiştir²⁹.

1990'lı yıllarda Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health-NIH) sponsorluğunda gerçekleşen PKOS konferansına kadar PKOS için farklı tanı kriterleri ve isimlendirmeler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları: polikistik over hastalığı, fonksiyonel over androjenizmi, hiperandrojenik kronik anovulasyon, polikistik over sendromu, sklerotik polikistik over sendromu ve polikistik ovarian sendromdur²¹. Araştırma ve klinik derneklerinin geniş çapta katılımı ile gerçekleştirilen konferansta PKOS tanımlamaları gözden geçirilmiştir. Uzlaşıya göre PKOS; hiperandrojenizm ve/veya hiperandrojenemi, oligoovulasyon ve ilişkili hastalıkların dışlanması öncüllerini sağlayan klinik durum olarak özetlenmiştir³⁰. Bu kriterler 2003 yılında Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Derneği (European Society for Human Reproduction and Embryology-ESHRE) ile Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (American Society for Reproductive Medicine-ASRM) tarafından Rotterdam'da düzenlenen konferansta güncellenmiştir. Rotterdam kriterlerine göre PKOS; 1) kronik oligo/anovulasyon, 2) klinik ve/veya biyokimyasal olarak hiperandrojenizm bulgusu varlığı, 3) polikistik overler kriterlerinden en az ikisinin varlığı olarak tanımlanmıştır³¹.

Tablo 2: Polikistik over sendromunun 2003 yılında uzlaşlan Rotterdam kriterleri.

PKOS Rotterdam Kriterleri (2003)
1- Oligo/Anovulasyon
2- Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm
3- Polikistik overler
Üç kriterden en az ikisi olmalı. Diğer nedenler dışlanmalı.

2.2. Ovaryum

Kadın pelvisinde yerleşik olan ve her iki tarafta bulunan ovaryumlar pelvis duvarına ikiye katlanmış periton (mezovaryum) ile tutunur. Ovaryum üreme dönemindeki gebe olmayan kadınlarda 4x2x3 cm boyutlarında oval biçimli bir organdır. Gebelikte boyutları ikiye katlanır, menarştan önce ise boyutu yaklaşık üçte biri büyüklüğündedir. Menapozla tekrar küçülürler. Ligamentum suspensoryum ovarii ile lateral yüzünden sağ tarafta çekum ve apendiksin, sol tarafta ise sigmoid kolonun peritonuna tutunur. Ligamentum ovarii proprium ile medial yüzünden uterusun kenarlarına tutunur. Mezovaryum ise tuba uterinalar ile bağlantısını sağlar. Ayrıca Lig. Suspensoryum ovarii ve Lig. ovarii propriumdan gelen damarlar mezovaryum içinde dallanarak ovaryumların hilusundan ovaryum içine girer³².

Ovaryumları dıştan saran germinatif epitel tek katlı alçak kübik yapıdadır ve gonadal kabartının yüzey epitelinden köken alır. Germinal epitelin altında tunika albuginea adı verilen damarlardan fakir düzensiz sıkı bağ dokusu bulunur. Ovaryumlar, histolojik olarak korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur. Korteks ve medulla stromasını damardan zengin gevşek bağ dokusu yapar³³.

2.2.1. Ovaryum Korteksi

Korteksin stromasında fibroblast benzeri hücreler (interstisiyel hücreler) yer alır. Ayrıca puberteye kadar primordiyal foliküller, puberteden sonra ise farklı evrelerdeki foliküller kortekste bulunur³³.

2.2.2. Ovaryum Folikülleri

Ovaryumda foliküller histolojik olarak gelişimlerine göre dört farklı tipte incelenir.

- Primordiyal foliküller
- Primer foliküller
- Sekonder foliküller (Antral foliküller)
- Graaf folikülü³³ (Graafian folikül- Reinier de Graaf: d.1641-ö.1673)³⁴

Primordiyal foliküller, foliküler gelişimin en erken basamağıdır. Primordiyal foliküller ovaryumun rezervini oluştururlar. İntrauterin 3. ayda görülmeye başlar. Üreme dönemindeki kadın ovaryumunda tunika albugineanın hemen altında korteks stroması içinde ayırt edilebilirler. Gonadotropin uyarısından etkilenmezler. Primer oositi çevreleyen tek katlı yassı folikül hücreleri bulunur³⁵. Tek katlı yassı hücrelere pregranüloza hücreleri de denir. Aralarında oluklu bağlantılar mevcuttur. Oosit ve pregranüloza hücreleri yerleştikleri bazal membran aracılığı ile stromadan beslenirler. İntrauterin yaşamdan puberteye kadar sayıları yaklaşık 7 milyondan 300 bine düşer. Menarştan menapoza kadar 450 civarında primordiyal folikül olgunlaşarak her siklusta ovulasyonu gerçekleştirir. Kalan foliküller ise farklı aşamalarda atreziye gider³⁶.

Aktifleşen primordiyal foliküldeki pregranüloza hücreleri kübik hücrelere dönüşürler. Primer oosit büyüyerek 100-150 µm çapına ulaşır. Granüllü endoplazma retikulumu (GER) genişler ve ribozomdan zenginleşir. Serbest ribozom miktarı artar.

Oositin çekirdeği büyür ve germinal vezikül adını alır. Folikül artık “unilaminer primer folikül” olarak adlandırılır. Foliküldeki pregranüloza hücreleri çoğalırlar ve çok katlı hücreler olarak organize olurlar. Bu evredeki primer folikül multilaminer primer folikül olarak adlandırılır. Pregranüloza hücreleri bu aşamadan sonra granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Zona pellusida multilaminer primer folikül aşamasında görünmeye başlar ve oositi çevreleyerek granüloza hücrelerinden ayırır. ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 olmak dört farklı glikoprotein içerir. Granüloza hücreleri sitoplazma membranından uzanan yalancı ayaklarını zona pellusida içersine doğru uzatarak oosit membranı ile oluklu bağlantılar kurar. Zona pellusida etrafında sıralanan bu tek sıra granüloza hücreleri “korona radiata” hücrelerini oluşturur. Folikül içinde değişiklikler sürerken stromada da değişiklikler başlar. Folikül komşuluğundaki stromal hücreler multilaminer primer folikülün etrafında organize olur ve bölgenin damarlanması artar. Bu yapıya “teka interna” denir. Teka internayı dıştan saran ve görece damardan fakir olan teka eksterna sarar. Teka interna hücrelerinin hücre membranlarında LH reseptörü ifadelenir, LH uyarısı ile steroidogenez başlar ve androstenedion sentezlenir. Granüloza hücreleri aromataz enzimi ile androstenedionu östrodiol çevirir. Granüloza hücreleri teka interna tabakasından kalın bir bazal membran ile ayrılır³³.

Granüloza hücre tabakası (membrana granüloza) kalınlaştıkça granüloza hücrelerinin aralarında yer yer boşluklar belirir ve sıvı birikmeye başlar (liquor folliculi-folikül sıvısı). Boşluğa sahip foliküle sekonder veya antral folikül adı verilir. Folikül artık gonadotropinlere duyarlıdır. FSH etkisiyle granüloza tabakası ve folikül hızla büyümeye devam eder. Folikül sıvısı kan plazmasından kaynaklanır ancak içeriği granüloza hücrelerinin ürünlerinden zengindir. Granüloza hücreleri glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar, steroid bağlayıcı proteinler üretir ve folikül sıvısına verir³³.

Büyüyen folikül ovulasyondan önce 2,5 cm çapa kadar ulaşır. Sekonder folikülde oluşan boşluklar birleşir ve antrum boşluğu adını alır. Folikül sıvısının artması ve membrana granülozanın incilmesiyle, geniş bir antrum içinde kalan oositin etrafını sadece korona radiatanın granüloza hücreleri çevreler. Oosit, granüloza hücreleri

aracılığıyla membrana granülozayla olan bağlantısına devam eder. Bu kompleks kumulus ooforus adı verilir. Korona radiatayı oluşturan granüloza hücrelerine kumulus granüloza hücreleri, membrana granulozaya bağlantıyı devam ettiren hücrelere ise mural granüloza hücreleri denir. Bu aşamaya gelmiş folikül Graaf folikülü olarak tanımlanır. Ovulasyon zamanı yaklaştıkça germinal epitel ile oosit arasındaki granüloza ve teka tabakaları incelir. Mural granüloza hücreleri dağınık ve oosit antral boşluğa düşer. LH'nın hızlı yükselmesi ile folikül rüptüre olur, oosit birinci polar cisimciğini atar ve sekonder oosit evresine geçerek periton boşluğuna bırakılır³³.

Ovulasyona uğrayan folikül korpus hemorajikuma dönüşür. Korpus hemorajikum içindeki pıhtı makrofajlar tarafından fagosite edilir. Lokal büyüme faktörleri, LH ve prolaktin etkisiyle korpus hemorajikum korpus luteuma dönüşür. Korpus luteum endokrin salgı bezi özelliği gösterir. Korpus luteum damarlanmadan zengin yapıya sahiptir, granuloza lutein ve teka lutein hücrelerini içerir. Granüloza lutein hücreleri korpus luteumun merkezinde yerleşirler, büyük ve hematoksilen eozin ile soluk boyanan sitoplazmaya sahiptirler. Sitoplazmalarında gelişmiş düz yüzlü endoplazma retikulumu (DER), Golgi kompleksi, GER ve çok sayıda mitokondriyon bulunur. Ayrıca lipid damlacıkları da mevcuttur. Granüloza lutein hücreleri progesteron üretirler ve östrojen dönüşümünü yaparlar. Teka lutein hücreleri korpus luteumun dışında yerleşir, teka interna hücrelerinden köken alır. Progesteron, östrojen ve androjenleri sentezler. Eğer siklusta gebelik gerçekleşmezse LH'ın düşmesiyle korpus luteum geriler (menstrasyonun korpus luteumu). Gebelik gerçekleşirse insan koryonik gonadotropini (hCG) etkisiyle korpus luteum sağkalımı sürdürülür ve plasenta östrodiol sentezini üstlenene kadar (gebeliğin 3. ayına kadar) hormon salgılamaya devam eder (gebeliğin korpus luteumu). Korpus luteumun gerilemesi esnasında fibroblast ve makrofaj invazyonu gerçekleşir. Fibroblastlar tip I kollagen ile fibröz yapı kurar. Yeni yapı korpus albicans olarak adlandırılır. Korpus albicans fibrotik kalıntı olarak ovaryum korteksinde bulunur³³.

2.2.3. Ovaryum Medullası

Ovaryum medullası damarlardan zengin fibroelastik bağ dokusundan oluşur. Premenstrual dönemde epitel benzeri interstisyel hücre kümeleri görülür. Bu hücreler östrojen salgılar. Hilus hücreleri ise androjen sentezleyen diğer ovaryum medullası hücreleridir³³.

2.3. Kan Folikül Bariyeri

Kan Folikül Bariyeri (KFB) hakkında ilk morfolojik çalışmalar 1950'lerde başlamıştır. Ovaryum foliküllerinin içi damar içermez. Teka interna kapillerden zengin yapısı ile foliküllerin beslenmesini sağlar. Folikül içi ortam ve mikroçevre kan folikül bariyeri ile kan plazmasından ayrılır. Kan folikül bariyerinin en önemli bileşeni folikülün bazal membranıdır. Hayvan deneylerinde KFB'nin 500 kilodaltondan küçük moleküller için geçirgen olduğu tespit edilmiştir. Daha büyük moleküller KFB'yi geçemez (ör:IgM)³⁷. Teka internadan folikül içine girecek olan protein, peptit, karbonhidrat ve iyonlar KFB'yi geçmek zorundadır. Farelerde yapılan çalışmalarda KFB'nin büyüklüğe göre seçiciliğinin yanında elektriksel yüke göre de seçici geçirgen olduğu bildirilmiştir⁶. KFB'nin elektriksel yük seçiciliği inter alfa tripsin inhibitör (ITI,220 kDa) molekülünü geçirmemesiyle anlaşılabilir. Ayrıca KFB heparan sülfattan zengin yapısı nedeniyle folikül dışından gelecek büyüme faktörlerini tutar. Bu özelliği ile intrafoliküler ortamı oosit ve granüloza hücreleri belirler³⁸.

Kan folikül bariyerini teka internadaki damarlardan itibaren endotel, endotel bazal membranı, teka internanın ekstrasellüler matriksi, folikül bazal membranı ve granüloza hücre tabakası oluşturur. KFB'ne teka interna damarlarının endoteli ve endotelin bazal membranının katkısı bilinmemektedir⁶. Folikül bazal membranı folikülogenez boyunca dinamik yapı gösterir. Tip IV kollagen ve laminin folikül bazal membranının temel molekülleridir. KFB'nin iskeleti entaktin, nidojen 1 ve 2 tarafından sabitlenir. Ayrıca bazal membranın yapısında heparan sülfat, perlekan,

kollagen tip 18 ve usherin de bulunur. Tip IV kollagen 3 adet alfa zincirden oluşur. Tip IV kollagenin yapısına katılabilecek altı farklı alfa zincir tanımlanmıştır. Benzeri şekilde laminin molekülü de beş farklı alfa, üç farklı beta, 3 farklı gama zincirinden oluşabilir³⁸.

Folikülogenez boyunca folikül bazal membranının yüzey alanı genişler ve içeriği değişir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda tip IV kollagenin erken folikül evrelerinde α 1-6 protein zincirlerinden oluşurken, ilerleyen folikül evrelerinde α 3-6 zincirlerinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Antral ve atretik foliküllerde ise tip IV kollagenin yapısında sadece α 1 ve α 2 zincirlerinin baskın olduğu izlenmiştir. Lamininin yapısı da benzer şekilde değişmektedir⁶. Folikül bazal membranında Laminin 121 (α 1 β 2 γ 1) eksprese olur. Bu molekül steroidogenez yapan epitel hücrelerin bazal membranında bulunur. Bunların yanı sıra nidojen 1 ve perlekan primordial folikül bazal membranında bulunmaz³⁸. Folikül bazal membranı ilerleyen evrelerde kollajenden fakir, lamininden zengin düzene sahip olur. Ayrıca perlekan ve heparan sülfat içeriği de folikül büyüdükçe artar ve elektriksel yüke bağlı geçirgenlik artar. Sonuç olarak farklı folikül evrelerinde farklı folikül içi mikroçevre hâkim olmaktadır. Folikül sıvısı tüm evrelerde serumdan farklı yapıya sahiptir ve bu mikroçevreyi granüloza hücreleri ve oosit belirler⁶.

2.4. Folikülogenez

Primordial germ hücreleri (PGH) embriyo bilaminer disk evresindeyken epiblast tabakasının posteriorunda farklanmaya başlar. İnsanlarda ve farelerde germ hücresi transkripsiyon faktörleri (BLIMP1, TFAP2C), germ hücresi faktörleri (NANOS3, DND1, DDX4, DAZL) ve pluripotensi ilişkili transkripsiyon faktörleri (OCT4, NANOG) eksprese ederler. Çalışmalarda embriyolojik gelişimleri incelenen deneysel memeli modelleri ile insan gelişiminin benzerlikleri ve germ hücresi transkripsiyon faktörlerinin ortaklığı düşünüldüğünde insan germ hücrelerinin de epiblastın posteriorunda farklanmaya başladığı görüşü kabul edilir³⁹. Ancak maymunlarda yapılan bir çalışmada PGH'lerinin amnion zarı epitelinden de köken aldığı

gösterilmiştir⁴⁰. İnsan PGH'lerinin gastrulasyon öncesi embriyoda ilk ne zaman ve nerede farklanmaya başladığı deney ve gözlem ile gösterilememiş olsa da bilaminer embriyon diski evresinde epiblastın posteriorunda ve amniyon kesesi epitelinde yerleştikleri konusunda konsensüs mevcuttur³⁹.

Gastrulasyon ile PGH'lerinin endoderme doğru göçü başlar. Mezoderm içindeki göçte interferon ile indüklenen transmembran (IFITM) proteinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Ancak IFTM proteinlerinin kaybı primitif çizginin posteriorundan endoderme olan PGH'lerin göçünü sekteye uğratmaz. Bu yolculuğun moleküler düzenlenimi aydınlatılmamıştır⁴¹.

Dördüncü haftada PGH'ler vitellüs kesesinin allantois ile komşu olan duvarında yerleşirler. Bu yerleşim embriyonun katlanmasıyla pasif olarak gerçekleşir⁴². PGH'nin barsak endodermindeki göçü sırasında hücrelerin siklusu G2 evresinde duraklar. PGH'lerin psödopodları ile endoderm bazal membranına tutunarak epitel içinde göç ederler⁴¹. Barsak endoderminde göç eden PGH'ler dorsal mezenterden genital kabartılara doğru yolculuğuna devam eder. Morfolojik olarak çoğu PGH psödopodlara sahiptir ve polarize hücrelerdir. Genital kabartıya olan göç stroma kökenli faktör-1 (SDF1; diğer adıyla CXCL12) ve kemokin reseptörü 4 (CXCR4) etkileşimi ile sağlanır. SDF1 genital kabartıdaki stromal hücrelerden salgılanır. Ayrıca göç boyunca c-Kit ve kit ligandı (KITL) PGH sağkalımını ve çoğalmasını sağlar. E-kaderin ekspresyonları artarak ekstrasellüler matriks ilişkisini sağlarlar. Genital kabartıya ulaştıklarında psödopodlarını ve polaritelerini kaybederler. İmmobil hücrelere dönüşürler⁴¹. Genital kabartıya ulaşan PGH inkomplet mitoz geçirirler ve gruplar halinde organize olurlar. PGH arasındaki sinsityumlardan organel alışverişi yapılabilir. İlerleyen dönemde gruptaki hücrelerin çoğu kaybedilerek birisi mayoz 1 de duraklar. PGH gruplarının etrafını somatik hücreler sarar⁴³.

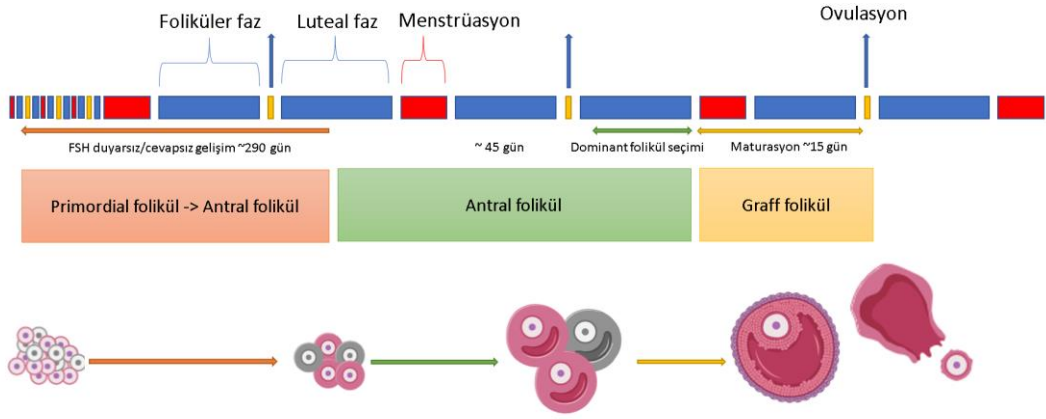
Genital kabartıda foliküllerin gelişimi iki dalga şeklinde olur. Birinci dalgada; medulladaki PGH gruplarının etrafını stromal hücreler sararak hızlıca folikülüne dönüşür. İkinci dalgada; kortekse yerleşen PGH grupları genital kabartı epitelinden köken alan hücreler tarafından sarılır. Bu hücreler pregranüloza hücreleridir ve ikinci

dalgaya gelindiğinde PGH'leri mayozda duraklar⁴⁴. Birinci dalgada bipotent stromal hücreler FOXL2 ekspresyonu yaparak pregranüloza hücrelerine farklılaşır. Ayrıca ikinci dalgadaki epitel kökenli pregranüloza hücreleri de FOXL2 ekspresyon ederler⁴⁵. Birinci dalgada medullada oluşan foliküller perinatal dönemde aktivite kazanırlar ve puberteden önce tamamı intertisyel dokuya dönüşür. İkinci dalgada oluşan foliküller puberteye kadar sessiz folikül olarak bekler⁴⁶.

İnsanda primordial folikül oluşumu 15-22 haftalar arasında başlar ve doğumdan sonrasına kadar devam eder⁴⁷. Puberteye erişen primordial foliküller için üç kader vardır: 1- menapozu kadar sessiz kalır, 2- aktifleşir ve farklı evrelerde atreziye gider, 3- aktifleşir, büyür ve ovulasyona uğrar⁴⁸. Folikül aktivasyonunu başlatan ana moleküller fosfatidilinozitol 3 kinaz (PI3K), rapamisin kompleksinin memeli hedefi 1 (mTORC1) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27 (p27Kip1) dır⁴⁷. PI3K yolu folikül aktivasyonunda en fazla araştırılmış yoldur. PTEN ve FOXO3a PI3K'ı negatif regüle eden moleküllerdir. PI3K'ın negatif regülasyonu bozulduğunda folikül aktivasyonu hızla gerçekleşir ve prematur ovarian yetmezlik tablosu ortaya çıkar⁴³. Granüloza hücrelerindeki mTORC1 aktivasyonu folikülün aktivasyonuna neden olur. p27Kip1 ise hücre döngüsünü durdurur ve kaybı folikül aktivasyonu ile sonuçlanır. PI3K ve mTORC1 folikül aktivasyonunu sağlamak yönünde, p27Kip1 ise folikülü sessiz halde tutmak yönünde etki yapar⁴⁷. KITL folikül aktivasyonunu ana düzenleyici molekül olarak görev alır^{49,50}. mTORC1 aktivasyonu ile granüloza hücrelerinden salgılanan KITL, oosit üzerindeki reseptörünü uyardığında oosit aktivasyonu gerçekleşir ve oosit büyümeye başlar^{47,49,51}. FSH ise primordial folikül aktivasyonunda direkt etkili değildir⁵¹. Aktivasyondan sonra büyüyen folikülde FSH reseptörü ifadelenir. Folikül "uyarılmış büyüme" evresine girer ve büyümesi hızlanır⁵⁰. Sekonder folikül evresine gelen folikülde KITL uyarısı ile antrum oluşur. KITL yokluğunda ise antrum oluşumu sekteye uğrar⁵². Büyüyen folikülde granüloza hücreleri aromataz ve inhibin sentezler. Aromataz östrodiol dönüşümü sağlar. Artan inhibin ve östrodiol FSH'yı baskılar. Ayrıca foliküler fazın sonlarında granüloza hücreleri LH reseptörü ekspresyon eder⁵⁰. Artan LH, foliküllerde FSH duyarlılığını azaltır³⁵. Bu şekilde diğer foliküllerin uyarılmış

büyümleri baskılanır. Büyümeye devam eden folikül maturasyon dönemine tek başına ulaşır ve LH etkisi ile ovulasyona uğrar^{50,53}.

Lokal faktörler ile aktiveleşen folikül preantral gelişimini ortalama 290 günde (~10 menstrüel siklus) tamamlar. Antrum oluşumundan preovulatuvar folikül evresine kadar ise yaklaşık 60 gün geçer (~2 menstrüel siklus). Dominant folikülün seçimi antral folikül evresindeyken olur. Luteal fazın sonunda seçilen folikülün ovulasyona kadar maturasyon için 15-20 güne daha ihtiyacı vardır (Şekil 2)⁵².



Şekil 2: Üreme çağındaki kadının menstrüel siklusunun şeması. Menstrüel siklus üzerinde normal folikül gelişimi kronobiyolojik olarak gösterilmiştir. (Bu şekil tarafımda çizilmiştir)

2.5. Folikül İçi Mikroçevre ve Hücrelerarası Etkileşim

Üreme çağındaki kadınlarda folikül gelişimi boyunca oosit mayoz I'in diptoten evresinden mayoz II'nin metafaz evresine kadar ilerler. Ovulasyona uğrayan oosit metafaz II evresine gelmiş sekonder oositir. Ovaryumun fizyolojik olarak en küçük yapı birimi olan folikülün mikroçevresi bu büyümeyi sağlar⁵⁴.

Folikül içi mikroçevre veya foliküler niş, major olarak granüloza hücresi ve oositin salgıladığı parakrin faktörler ile oluşur. Bu kavramlar sıklıkla granüloza hücresi ve oositin karşılıklı etkileşimini de içine alır. Granüloza hücreleri oosit ile transzonal uzantılar (TZPs-transzonal projections) ile bağlantı kurar. Bu bağlantıların ucunda oluklu bağlantılar bulunur. Oluklu bağlantılar aracılığı ile küçük moleküller (<1kDa) ve iyonların alışverişi gerçekleşir⁵⁵. Granüloza hücreleri oosite aminoasit ve piruvat sağlar⁵⁶. Ayrıca cAMP ve cGMP ile oositi mayotik arrestte tutarak oositin erken folikül evrelerinde mayozu devam etmesini önler⁵⁵.

Granüloza hücrelerinden salgılanan parakrin faktörlerden başlıcaları; östrojen, aktivin, inhibin ve KIT liganddır (KITL)⁵⁵. Granüloza hücresi ve oosit arasındaki etkileşim açısından en çok çalışılmış sinyal molekülü KITL'dir. KITL granüloza hücresi tarafından salgılanır, oosit üzerindeki reseptörüne tutunarak sessiz folikülün aktivasyonunu sağlar⁵⁵. Özetle KITL, primordial germ hücrelerinin göçü, proliferasyonu, sağkalımı; primordial foliküllerin aktivasyonu; granüloza hücrelerinin proliferasyonu; mayozdaki duraklamanın devamlılığı ve ovaryumdaki steroidogenezin düzenlenmesinde görev alır⁵⁷.

2.6. Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınların %5-20'sini etkiler¹. Günümüzde anovulasyon bulgusu olan kadınların %55-91'i PKOS'dur⁵⁸. Üremeye Yardımcı Tedavi Kliniklerine (ÜYTE) başvuran kadın hastaların %20'sini PKOS'lu veya polikistik over morfolojisine sahip hastalar oluşturmaktadır³. Daha önce anlatılan, 2003 yılında oluşturulmuş Rotterdam kriterleri halen PKOS tanısında güncelliğini korumaktadır (Tablo 2). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health-NIH)'nin 2012 yılında yaptığı konsensüs panelinde alınan karar ile Rotterdam (2003) kriterleri detaylandırılmıştır. Panelde alınan kararlara göre PKOS; Fenotip A: hiperandrojenizm, oligo-anovulasyon ve polikistik over morfolojisi, Fenotip B: hiperandrojenizm ve oligo-anovulasyon, Fenotip C: Hiperandrojenizm ve

polikistik over morfolojisi, Fenotip D: Oligo-anovulasyon ve polikistik over morfolojisi olmak üzere dört fenotipte sınıflandırılmıştır (Tablo 3)⁵⁹.

Tablo 3: NIH'in yaptığı panelde varılan uzlaş. HA: klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm, OA: oligo-anovulasyon, PKOM: polikistik over morfolojisi. *PKOM: Hacmi 10 cm³'ten (veya 10mL) daha büyük olan en az bir ovaryum varlığı veya korteksinde artmış antral folikül sayısı veya her iki durumun da varlığı olarak tanımlanır. Antral foliküller 2-9 mm çapındadır ve tüm ovaryumda en az 12 adet bulunmalıdır⁵⁹.

NIH Konsensüsü (2012)
Rotterdam (2003) kriterleri kullanılmaya devam edilmeli, ancak sendromun spesifik fenotipleri de eklenmeli.
• Fenotip A: HA+OA+PKOM*
• Fenotip B: HA+OA
• Fenotip C: HA+PKOM*
• Fenotip D: OA+PKOM*

2.6.1. PKOS'un Klinik Bulguları

PKOS'ta puberteden itibaren menstruel disfonksiyon genellikle görülür. Oligomenore veya amenore en sık bulgudur. Oligo-anovulasyon eşlik edebilir. Genellikle normal veya hafif uzamış menarş öyküsü mevcuttur. Menarşı takiben düzensiz adet siklusu şikâyeti vardır. Hastaların çoğunda ortalama LH seviyesinde artma görülür. LH pikinin frekansı da uzamıştır. FSH miktarı normal veya düşük olarak ölçülebilir. Erken foliküler fazda LH/FSH oranında artma tek başına LH veya FSH ölçümlerinden daha değerlidir. Ancak hem LH hem FSH hem de LH/FSH oranı tanıda değerli değildir. Endometrial kanser riski artar. Antral ve Graaf foliküllerinin miktarında azalma, preantral foliküllerin miktarında artma görülür. Atretik folikül

oranı da artar. Yaşa göre ortalama AMH miktarı yüksektir. Gebeliklerinde spontan abortus, preeklampsi ve preterm eylem riski daha yüksektir. PKOS'lu kadınların doğum sonrası bebeklerinde yeni doğan yoğun bakım ihtiyacı artar. Hiperandrojenizme bağlı hirsutizm görülebilir. Obezite ve insülin direnci PKOS'lu kadınların yarısında izlenir. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı sıklığı artar. Metabolik sendrom ve tip 2 diyabet hastalığı riski de sağlıklı kadınlara göre daha yüksektir. Bunlara bağlı olarak PKOS'ta uyku apnesi, dislipidemi, venöz tromboembolizm ve koroner arter hastalığına yatkınlık mevcuttur. Depresyon, anksiyete bozukluğu ve yeme bozukluklarına yatkınlık izlenir⁶⁰.

2.6.2. PKOS'un Patofizyolojisi

PKOS klinik olarak üreme çağındaki kadınları etkileyen multifaktöriyel bozukluklardandır. PKOS tanısı sıklığı açısından monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere göre iki katı korelasyon görülmesi genetik yatkınlık varlığını gösterir. Yüksek verimli gen ilişkisi analizi sonuçlarına göre çinli kadınlarda INSR, FSHR ve C9orf3 genleri PKOS ile ilişkilidir. Avrupalı kadınlarda ise GATA4-NEIL2, FSHB-ARL14EP, ERBB4, RAD50 ve KRR1 genleri PKOS ile ilişkilidir¹.

PKOS'lu kadınlarda primordial folikül sayısı sağlıklı kadınlara benzerdir. Ancak sağlıklı kadınların ovaryumlarına göre iki-üç kat fazla sayıda antral folikül gözlenir. Bu foliküllerin seçimi ve Graaf foliküle erişip ovulasyona uğraması bozulmuştur. Yani PKOS, folikülogenez problemleri açısından iki kısımda incelenebilir. Birincisi erken foliküler gelişimdeki bozulma, ikincisi ise antral folikülden sonraki evrede (postantral) folikül seçimi ve maturasyon bozukluğu sonucu Graaf folikülün oluşmamasıdır (foliküler arrest)⁵⁰. Normal koşullarda FSH etkisiyle büyümesi hızlanan foliküller, LH etkisiyle maturasyonunu tamamlar ve ovulasyona uğrar. PKOS'ta artan LH/FSH oranı, ovaryumdaki FSH direnci ve teka internadan androjenlerin hipersekresyonu sonucu folikül gelişimi durur. Dominant folikül seçimi gerçekleşemez ve ovulasyon sekteye uğrar. Ayrıca ovaryum içindeki faktörlerdeki bozulmalar folikül gelişimindeki bozukluktan sorumludur [TGF β ailesi (AMH, inhibin, Aktivin, BMPs ve GDFs gibi)]. Ovaryum içi moleküllerin çoğu membrana granüloza kaynaklıdır¹. PKOS'lu kadınların

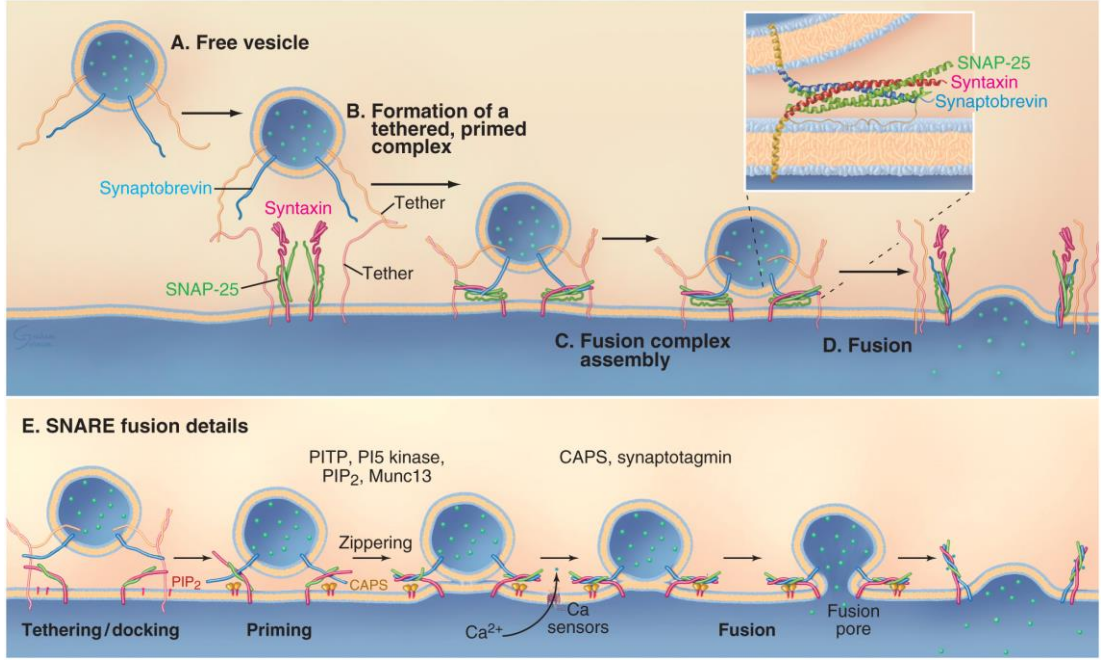
folikül sıvısı ve kanında KITL düzeyi normale göre anlamlı düşer. KITL'in c-Kit (KITL reseptörü) ile etkileşimi ile uyarılan PI3K/Akt yolu hem folikül aktivasyonunu sağlar hem de folikül içinde apoptozisi inhibe eder. KITL'in inhibisyonunda preantral folikülogenez, antrum oluşumu ve ovulasyon bozulur⁶¹. Ooist BMP-15 salgılayarak KITL'i pozitif yönde düzenlerken, GDF-9 salgılayarak negatif yönde düzenler⁶². PKOS'ta GDF-9 düzensizliği de bildirilmiştir¹. GDF-9'un artmasıyla bazal ve LH ile indüklenmiş intraovarian androjen üretimi artar⁵⁰.

Folikül arresti, dominant folikül seçilmesinin durması ve seçilmeye aday folikül sayısında artma olarak tanımlanır. PKOS'ta folikül arresti oligo-anovulasyonun nedenidir. Farmakolojik uyarma (ovulasyon indüksiyonu) ile gelişimi durmuş foliküller tekrar gelişimine devam edebilirler ve ovulasyon gerçekleşir. FSH'nin döngüsel yükselmesi PKOS'ta bozulmuştur, ancak bu durum folikül duraklamasının nedeni değil sonucudur. Dominant folikül büyümesinin en güçlü uyarıcısı IGF-1'dir. Araştırmacılar IGF-1'deki düzensizlik folikül duraklamasına neden olduğunu düşünmektedir. Ancak şimdiye kadar bu hipotez kanıtlanamamıştır. Diğer bir lokal faktör olan AMH'nin folikül içi düzeyi artmıştır. Folikül içinde AMH'nin artışıyla folikül duraklaması olduğu düşünülmektedir. LH pikindeki bozulma ve döngü süresindeki uzamalar da prematür LH etkinliği sonucu olarak folikül gelişiminde duraklamaya neden olur.

2.7. Vezikül Füzyonu Hipotezi ve Vezikül Dinamiği

Hücrenin kendi içinde ve çevresi ile haberleşmesi vezikül taşınması ile gerçekleşir⁶³. Hücre tarafından sentezlenmiş ürünler hücre membranı dışına ekzositoz ile taşınır. Ayrıca hücre membranının yapısal bileşenleri de (glikoproteinler, steroidler, fosfolipidler ve glikolipidler gibi) ekzositoz ile plazma membranına kazandırılır⁶⁴. Vezikül membranı ile plazma membranının kaynaşması için membranların bükülmesi gerekir. Kaynaşma ile ara sap oluşur, bu sapın büyümesi sonucu "füzyon geçidi" (fusion pore) genişler. Bunun sonucunda vezikül membranı plazma membranına katılır, vezikül içeriği ise hücre dışına çıkar. SNARE (soluble N-

ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) molekülleri membranları birbirine çekerek vezikül membranının füzyonun gerçekleşeceği hedef membran ile kaynaşmasını sağlar. Membranların kaynaşması için her iki membranda da SNARE proteinleri bulunmalıdır. Vezikül üzerinde bulunana v-SNARE, füzyonun gerçekleşeceği hedef membranda bulunana t-SNARE adı verilir. Her iki SNARE molekülünün buluşması ile oluşan SNARE kompleksine “trans-SNARE” denir. Sinaptik vezikül füzyonu en çok çalışılmış vezikül füzyon mekanizması olduğu için füzyon mekaniği sinaptik vezikül füzyonundan anlaşılabilir. Sinaptik veziküller v-SNARE olarak sinaptobrevin taşır, hücre zarında ise t-SNARE olarak sintaksin ve SNAP25 bulunur. SNARE kompleksi, Munc18 bağlı iken inaktiftir. Ca^{+2} etkisiyle kompleks aktiflenir ve füzyon gerçekleşir. Füzyondan sonra membranda kalan SNARE kompleksi cis-SNARE yapısındadır. cis-SNARE kompleksi NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) etkisiyle ATP kullanılarak plazma membranından ayrılarak tekrar kazanılır⁶⁵.



Şekil 3: SNARE proteinleri aracılı membran füzyonuna nörotransmitter salınımı örnektir. A, v-SNARE olarak sinaptobrevin (mavi) taşıyan bir vezikül plazma membranına yaklaşmakta. Plazma membranında t-SNARE olarak sintaksin (kırmızı) ve SNAP-25 (yeşil) görülmektedir. B, v-SNARE ve t-SNARE bağlanarak inaktif kompleks oluşturur. C, Uyarı geldiğinde trans-SNARE kompleksi aktifleşir ve membranları yaklaştırır. D, Membranlar kaynaşır ve cis-SNARE kompleksi membranda kalır. E, SNARE aracılı vezikül füzyonuna yakından bakış. (Cell Biology, Thomas D. Pollard, 3. Baskı 2017, Elsevier'ın 4999460954678 numaralı izniyle kullanılmıştır.)

Ekzositoz sadece nöronlarda gerçekleşmez. Endokrin salgı yapan hücrelerde de ekzositoz araştırılmıştır. Endokrin hücrelerde düzenlenmiş salgı yolağının hem hızlı ekzositoz yolu hem de yavaş ekzositoz yolu hücre içi kalsiyum sinyali ile düzenlenir⁶⁶. SNAP25, endokrin ve nöroendokrin hücrelerde düzenlenmiş salgı yolağının SNARE kompleksi basamağında ana SNARE molekülüdür^{67,68}. SNAP25 hem ekzositoz veziküllerindeki füzyon kompleksinde görevlidir⁶⁹ hem de kalsiyum kanallarını kontrol ederek düzenlenmiş salgı yolağında görev alır⁶⁶⁻⁶⁸. İnsan spermünde gerçekleşen

akrozom reaksiyonu da düzenlenmiş salgı yolu için örnektir. Akrozom reaksiyonu; protein kinaz A aracılığı ile fosforillenen kalsiyum kanallarının açılması ve cAMP'nin nükleotit ilişkili kanalları uyarmasıyla hücre içi kalsiyumun artması sonucu gerçekleşir. Kalsiyum, memeli hücrelerinde düzenlenmiş salgı yolağının temel düzenleyicisidir⁷⁰. Granüloza hücrelerinde de FSH uyarısı ile hücre içi kalsiyum miktarı artar^{71,72}. Kandaki glukoz konsantrasyonunda artış insülin sekresyonu yapan β hücrelerinde Ca^{+2} artışına neden olur. Hücre içindeki Ca^{+2} artışıyla Munc18, SNAP-25 ve sinaptotagmin etkinliği düzenlenir. Tip 2 diyabette β hücrelerinde vezikül füzyon proteinlerinde değişimler gösterilmiş ve vezikül füzyonunun bozulmasıyla ekzositozun aksadığı tespit edilmiştir⁷³.

SNAP25, SNARE kompleksinin plazma membranına yerleşen üyelerindedir. Fare granüloza hücrelerinde de SNAP25 ekspresyonu mevcuttur. Progesteron reseptörü susturulmuş farelerin granüloza hücrelerinde ise SNAP25 ekspresyonu azalır¹². Ayrıca rekombinant SNAP25 eklenmesiyle granüloza hücrelerinde steroidogenez artar. SNAP25'in susturulması ise steroidogenezde belirgin düşmeye neden olur. Steroidogenezdeki bu bozulma mitokondriyona kolesterol taşınmasının aksaması nedeniyle oluşur⁷³. Birçok hücre tipinde Stx6 erken endozom ve trans-Golgi ağında görev alan temel vezikül füzyon proteini. Endokrin ve nöroendokrin hücrelerde Stx6 immatür salgı veziküllerinin homotipik füzyonunda görev alır. Golgi aygıtından plazma membranına olan yolculukta immatür veziküllerin homotipik füzyon ile olgunlaşmasını sağlar. Ayrıca Stx6, erken endozomdan plazma membranına yeniden kazanımda görevlidir. Stx6 pankreas beta hücrelerinde ve immün sistem hücrelerinde düzenlenmiş salgı yolağında görev alır. Stx6 inhibisyonu ile adipositlerde GLUT4 reseptörünün internalizasyonu ve membrana yeniden kazanımı bozulur. GLUT4 reseptörünün internalizasyonu ve plazma membranına yeniden kazanımı Stx6 aracılı gerçekleşir¹⁹. Meme, kolon, karaciğer, pankreas, prostat, mesane, deri, testis, dil, serviks, akciğer ve mide kanserinde Stx6 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Renal hücreli karsinom hücre hattında yapılan çalışmalarda Stx6'nın plazma membranında lipid rafların dinamiğinde rol oynadığı gösterilmiştir. VEGFR2, integrin ve kaveolin1 proteinlerinin lipid raflardaki organizasyonu Stx6

aracılı olmaktadır. Ayrıca glikofosfatidilinozitol (GPI) ve GM1 gangliozid (GM1)'ler de hücre membranına Stx6 aracılığıyla taşınır⁷⁴. Nötrofillerde ise salgı granüllerinin plazma membranı ile kaynaşması Stx6 aracılı olur⁷⁵. Ayrıca Stx6 hücre içi kolesterol trafiğinde kolesterol bağlayıcı protein olarak görev alır⁷⁶. Kolesterol ve membran glikosfingolipidlerinin retrograd taşınması Stx6 aracılığıyla mümkün olur¹⁹. Stx6 Golgi aygıtından çıkan veziküllerin hedeflerine taşınmasında ana görevli SNARE proteindir. Bu bilgiler ışığında Stx6 hücre membranındaki lipid raftların organizasyonunda⁷⁴, hücre içi vezikül trafiğinde, immatur salgı veziküllerinin maturasyonunda^{75,77} ve ekzositozda^{75,78} rol almaktadır. Stx6, ekzositoz görevini SNAP23, SNAP25 ve SNAP29 ile etkileşerek yapar. Membran füzyonundan sonra geri kazanılır ve işlevine devam eder⁷⁵. SNARE molekülleri membran füzyonu için yeterlidir, ancak ekzositozdaki zamansal ve uzaysal kısıtlılıkları azaltmak için yardımcı faktörler bulunur. Sec/Munc18 (SM) ailesi vezikül füzyonunun gerçekleşmesine yardımcı olan protein ailesidir⁷⁹. StxBP1 (diğer adıyla Munc18-1) SM protein ailesindedir⁸⁰ ve ekzositozda vezikül füzyonunun düzenlenmesinde görevlidir⁷⁹. Pankreasın β hücrelerinde insülin ekzositozu sırasında vezikül füzyonunu düzenler. Yağ asidinden yüksek ortamda β hücrelerinde StxBP1 düzeyi düşer ve insülin ekzositozunda azalma oluşur⁸¹. İnsan β hücrelerinde StxBP1'in susturulması ile insülin sekresyonu bozulur⁸². Ayrıca bağırsak epitelinde yerleşen L hücrelerinin GLP-1 (glukagon benzeri peptit 1) salgılaması da StxBP1 aracılığı ile düzenlenir⁸³.

Vezikül füzyon proteinlerindeki bozukluklar epilepsi, mental retardasyon, otizm spektrum bozukluğu, ailesel hemofagositik lenfohistiyositoz, Tourette sendromu, CEDNIK (Cerebral dysgenesis-neuropathy-ichthyosis-palmoplantar keratoderma) sendromu, şizofreni, mikrovillus inklüzyon hastalığı, tip 2 diyabet, psödohipoparatiroidizm ile ilişkili bulunmuştur⁸⁴.

2.8. İnsan Ovaryumunda Vezikül Dinamiğinin Rolü

FSH reseptörü G-proteini ilişkili reseptör ailesindedir. Plazma membranında integral protein olarak yerleşen FSHr; ekstrasellüler kısım, transmembran kısım ve

intraselüler kısım olmak üzere üç kısımda incelenir. Ekstraselüler kısmı FSH'nın bağlandığı kısımdır. Transmembran kısmı hidrofobik özellik gösterir. İntraselüler ve ekstraselüler kısım hidrofilik özellik gösterirler. İntraselüler kısım G-proteini ve diğer sinyal molekülleri ile ilişki içindedir ve sinyal iletimini sağlar. Ayrıca intraselüler kısım reseptör internalizasyonunu sağlayan kısımdır⁸⁵. FSH reseptörünün regülasyonunda en önemli görevi FSH üstlenir. Granüloza hücrelerinde FSH uyarısı ile FSHr azalması gerçekleşir⁸⁶. Granüloza hücrelerinde hCG uyarısı ise FSHr'yi artırır⁸⁷.

FSH reseptörünün uyarılması ile reseptörün intraselüler kısmında G-proteini ayrılır ve plazma membranına bağlı olan adenilil siklazı aktive eder. Adenilil siklazın aktive olmasıyla cAMP miktarı artar. cAMP, Protein Kinaz A'yı aktifler ve hedef moleküllerin fosforilasyonunu sağlar. FSHr aktiflendiğinde Protein Kinaz A'dan bağımsız yollardan da fosforilasyon uyarılır. Bunların yanında cAMP bağımlı ve cAMP bağımsız yollardan hücre içi Ca²⁺ miktarı artar⁸⁵. Granüloza hücreleri FSH uyarısına yanıt olarak insülin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II), inhibin, aktivin, vasküler endotelial faktör (VEGF)⁵⁵ ve KITL⁸⁸ salgılar. Reseptör internalizasyonu reseptör aktifleştikten sonra oluşur ve reseptörün plazma membranından sitoplazma içine endozomal kompartmana taşınması olayıdır. Primer amaç reseptörün ligandı ile uyarılması sonucu duyarsızlaştırılmasıdır. Reseptör internalizasyonu klatriin aracılı endositoz ile gerçekleşir⁸⁹. Endozomal kompartmana yer değiştiren reseptör plazma membranına yeniden kazandırılabilir veya degrade olabilir⁹⁰.

Kadın üremesinde folikülogenez ve folikül atrezi arasındaki denge önemli rol oynar. Bu süreçler farklı evrelerde farklı ovaryum içi faktörler ve nöroendokrin faktörler tarafından düzenlenir¹⁵. Kan folikül bariyerinin varlığı nedeniyle folikül içi faktörlerin başrolleri granüloza hücreleri ve oositler⁶. α -SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-NSF attachment protein) SNARE kompleksinin ayrılmasını sağlar. Fare granüloza hücrelerinde peripubertal dönemde düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca postpubertal dönemde gonadotropin uyarısıyla ekspresyon düzeyi artmaktadır. α -SNAP mutant farelerde postpubertal dönemde tüm foliküllerin sayısı azalır, ilerleyen evredeki foliküllerde dramatik azalma görülür. Atretik folikül sayısı α -SNAP mutant farelerde mutant olmayanlara göre 7-10 kat artar. Ayrıca ovulasyon

oranlarında azalma, östrus süresinde uzama, gebelik oranlarında azalma görülür¹⁵. SNAP25 düzeyleri granüloza hücrelerinde gonadotropin etkisiyle artar¹⁴. SNAP25'in susturulduğu granüloza hücrelerinde progesteron sentezi azalır. Ayrıca granüloza hücresi steroidogenezinde Stx5 ve Stx17 de rol alır⁹¹. SNAP25'in susturulması ile granüloza hücrelerinden interlökin sekresyonu azalır¹². Fare granüloza hücrelerinin fare adrenal bezi hücrelerine ve fare Leydig hücrelerine göre daha yüksek düzeyde Stx6 eksprese ettiği bildirilmiştir⁹¹. PKOS'ta ortaya çıkan subfertilitenin sebebi folikül gelişiminin duraklamasıdır. Duraklamanın folikül içi faktörlerin düzenlenmesindeki bozulma sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Hücrelerin sentez veya salgılama fonksiyonunda bozulmanın sonucu olarak folikül içi faktörlerin miktarındaki değişiklik gelişebilir veya her iki fonksiyondaki bozulma da folikül duraklamasının nedeni olabilir. Bu doğrultuda araştırma sorusu "PKOS'ta ovaryum folikülleri içindeki hücreler arası etkileşim, granüloza hücrelerindeki veziküler füzyon ve/veya ekzositozun değişimi ile bozulmakta mıdır?" olarak belirlenmiştir. Araştırma sorusuna yanıt verebilmek için hedef olarak; "PKOS'ta granüloza hücresinin KITL düzeyleri ve FSH'nın buna regülatör etkisi azalır mı? SNAP25, StxBP1 ve Stx6'nın düzeyleri granüloza hücresinde FSH'nın etkisi ile artar mı? PKOS'ta SNAP25, StxBP1, Stx6 ve KITL düzeyleri granüloza hücresinde kontrol grubuna göre azalır mı? PKOS'ta SNAP25, StxBP1, Stx6 ve KITL'in düzeyleri FSH-hCG uyarısı ile değişir mi? PKOS'ta FSH-hCG uyarısı ile oluşan salgı vezikülü cevabı bozulur mu?" belirlenmiştir.

Bu çalışmada amacımız; PKOS tanılı ve sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinin çevresi ile etkileşimindeki değişimi anlamak üzere, vezikül füzyon proteinlerinden SNAP25, StxBP1 ve Stx6 ifadelerindeki değişiklikleri incelemektir. ÜYTE laboratuvarında in-vitro fertilizasyon önerilmiş PKOS hastaları ile erkek infertilitesi nedeniyle başvurmuş sağlıklı kadınların kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde veziküler füzyonda ve/veya ekzositozda görev alan proteinlerin ifadesinde anlamlı değişim varlığı araştırılmıştır. PKOS'lu ve sağlıklı katılımcılardan elde edilen granüloza hücrelerinin FSH-hCG uyarısına verdikleri SNAP25, StxBP1, Stx6, KITL ve FSHr ifadelerindeki yanıt da araştırılmıştır. Sağlıklı ve PKOS'lu katılımcıların granüloza

hücrelerinde in-vitro FSH-hCG uyarısı ile salgı veziküllerindeki değişim de elektron mikroskopu ile incelenmiştir.

Araştırma kapsamında vezikül füzyon proteinlerinden SNAP25, StxBP1 (Munc18) ve Stx6 incelenmiştir. FSH-hCG uyarısına verilen vezikül yanıtı elektron mikroskopik inceleme ile değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran Rotterdam kriterlerine göre PKOS tanısı konmuş ve bu nedenle yardımcı üreme teknikleri önerilmiş üreme çağındaki kadınlar (n=10) ile erkek infertilitesi nedeniyle yardımcı üreme teknikleri önerilmiş üreme çağındaki sağlıklı kadınların (n=10) dahil edilmiştir. Komorbiditesi olan kadınlar çalışmaya alınmamıştır. Katılımcılar vücut kitle indeksi 18,5-24,9 kg/m² aralığında⁹² olan bireylerden seçilmiştir. Ayrıca HGL5 (Immortalized Human Granulosa Cells (HGL5), cat: T0650, abm, Amerika Birleşik Devletleri) hücre hattı üçüncü grup olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1. Etik Kurul İzin Süreci

“Polikistik Over Sendromunda Ekzositoz İlişkili SNARE Moleküllerinin Granüloza Hücrelerinde İn Vitro Değerlendirilmesi” başlıklı proje çalışması, 18 Haziran 2019 tarihinde T.C. Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Çalışmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Çalışma 2019/16-09 numaralı karar ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmamızda araştırma sorularını cevaplamaya yönelik kontrol, PKOS ve HGL5 olmak üzere üç ana grup bulunmaktadır. Her grubun indüklenmiş ve indüklenmemiş olmak üzere iki alt grubu oluşturuldu (Tablo 4). Kültüre edilmiş granüloza hücrelerinin indüksiyonu 10 IU/ml hCG ve 0,5 IU/ml konsantrasyonda FSH içeren komplet besiyeri ile 24 saat boyunca 37 °C 'de, nemli ve %5 CO₂ içeren kültür inkübatöründe yapıldı.

Tablo 4: Deney gruplarının dağılımı

Grup	Alt grup	Açıklama
HGL5	Uyarılmış	Uyarılmış: FSH-hCG içeren komplet besiyeri ile 24 saat 37 °C, nemli ve %5 CO ₂ koşullarında inkübasyon
	Uyarılmamış	
Kontrol (Sağlıklı, Erkek Faktörü)	Uyarılmış	Uyarılmamış: Komplet besiyeri ile 24 saat 37 °C, nemli ve %5 CO ₂ koşullarında inkübasyon
	Uyarılmamış	
PKOS	Uyarılmış	Uyarılmamış: Komplet besiyeri ile 24 saat 37 °C, nemli ve %5 CO ₂ koşullarında inkübasyon
	Uyarılmamış	

3.3. Folikül Sıvısının Temini

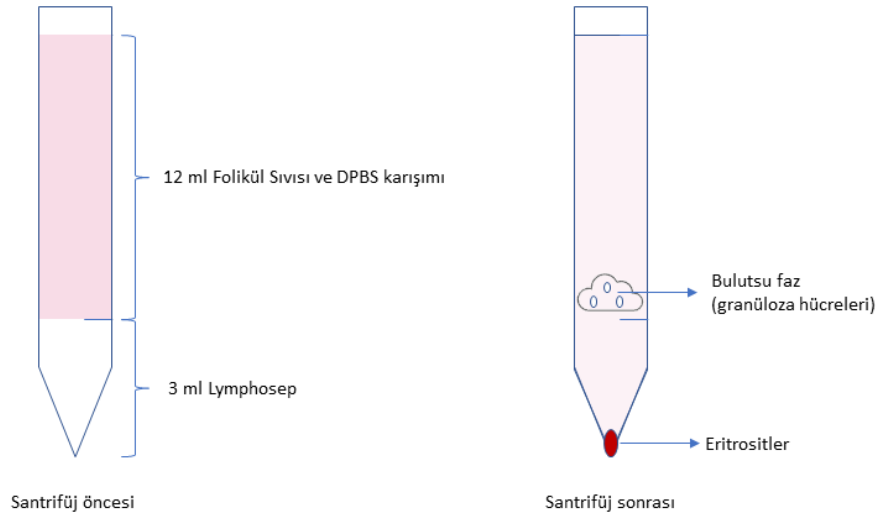
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedaviler (ÜYTE) Kliniğinde in-vitro fertilizasyon için uygun bulunan 10 PKOS, 10 sağlıklı kadın katılımcı araştırmaya dahil edildi. Hastalara yaşına, kilosuna, infertilite nedenine, bazal antral folikül sayısına, AMH/FSH seviyesine, daha önce ovulasyon indüksiyonu yapıldıysa buna verilen ovaryum cevabına göre gonadotropin uygulaması ile ovulasyon indüksiyonu yapıldı. Oosit toplama (oocyte pick up- OPU) işlemiyle alınan folikül sıvısından oositler stereo-mikroskop altında toplandıktan sonra, araştırma amaçlı çalışma için aydınlatılmış onamı alınan hastaların kalan folikül sıvıları ve toplanan oositlerin denüstasyon işlemi yapıldıktan sonra kalan kumulus hücreleri steril koşullar altında Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarına getirildi.

3.4. Folikül Sıvısından ve Denüstasyon Artığından Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu

Folikül sıvısındaki granüloza hücrelerinden eritrosit, lökosit ve makrofajları ayırmak için Golos ve arkadaşlarının yöntemi temel alındı⁹³. Gradyent temelli olan bu izolasyon yöntemi kendi deneyimize göre modifiye edilerek kullanıldı⁹⁴. Steril kaplar içinde hücre kültürü laboratuvarına getirilen folikül sıvıları laminar akım kabinine alındı. 1:1 oranında DPBS (Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg, Capricorn Scientific, Almanya) ile dilüe edildi. İçinde 3 mL Lymphosep (lymphocyte separation medium, density 1.077 g/mL, Capricorn Scientific, Almanya) ayrıştırma solüsyonu bulunan konik tabanlı 15 cc'lik santrifüj tüplerine faz oluşturacak şekilde 12 mL folikül sıvısı/DPBS karışımı konuldu. 30 dakika boyunca 2500 rpm (600g) hızında santrifüj edildikten sonra orta kısımda oluşan bulutsu faz (granüloza hücreleri) serolojik pipet ile alınarak yeni santrifüj tüpüne konuldu (Şekil 4). Ayrıca oosit denüstasyonundan sonra elde edilen kumulus granüloza hücrelerini içeren sıvı, parafin yağının altından otomatik pipetör ile alınıp granüloza hücrelerine eklendi. Yeni santrifüj tüpünde biriktirilen granüloza hücreleri ve kumulus hücreleri bazal medium (DMEM/Ham's F-12, w/o L-Glutamine, with 15mM HEPES, Capricorn Scientific, Almanya) ile 15 mL'ye tamamlanıp 1200 rpm'de (260g) 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atılıp pelet (granüloza hücreleri) 2 mL komplet besiyeri ile çözüldü.

ÜYTE kliniği embriyoloji laboratuvarında stereomikroskop ile alınan oositler oosit-kumulus kompleksi halinde toplandıktan sonra hiyaluronidaz içeren denüstasyon solüsyonu ile (Hyase-10x, Vitrolife, İsveç) denüde edildi. Etrafındaki granüloza hücrelerinden ayrılan oositler üremeye yardımcı tedavi işlemleri için alındıktan sonra kalan granüloza hücreleri steril koşullar altında Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na getirildi. Sıvı parafin altında bulunan granüloza hücrelerini içeren sıvı otomatik pipet ile alındı. Steril santrifüj tüpünde 3 mL komplet besiyeri ile karıştırılarak 1200 rpm hızında (260 g) 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1:1 oranında komplet besiyeri ile çözüldü.

Komplet besi yeri: DMEM/F12 (DMEM/Ham's F-12, w/o L-Glutamine, with 15mM HEPES, Capricorn Scientific, Almanya), %5 FBS (Fetal Bovine Serum, Collected in South America, Capricorn Scientific, Almanya), %4 L-Glutamin (L-Glutamine, 200 mM, Capricorn Scientific, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Penicillin/Streptomycin Solution 100x, Capricorn Scientific) hacimlerinde hazırlanmış besiyeridir.



Şekil 4: Santrifüj tüpünde bulutsu fazın görülmesi.

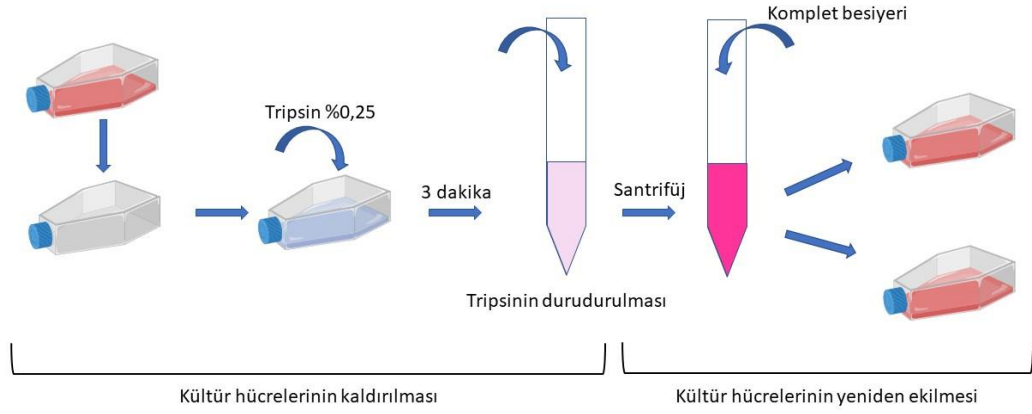
3.5. HGL5 ve Primer Granüloza Hücrelerinin Ekilmesi ve Çoğaltılması

Oluşan granüloza hücreleri peletinin miktarına göre granüloza hücreleri, T25 veya T75 kültür kabına 1:1 oranında olacak şekilde komplet besiyeri ve BIOAMF-1 (BIOAMF-1 Basal Medium+Supplement, Biological Industries, İsrail) karışımı ile ekildi. Kültür kapları optimum kültür koşullarındaki (37 °C, %5 CO₂, nemli ortam) inkübatöre (Heraeus HeraCell 150 CO₂ incubator, Almanya) kaldırıldı. Hücreler tutunduktan sonra besiyerleri iki günde bir komplet besiyeri ile değiştirildi.

Araştırma laboratuvarımızdaki sıvı azot tankında (Carbide 35HC LN2, Taylor Wharton Union, Amerika Birleşik Devletleri) -196 °C sıcaklığında kriyovialler (6122-SO, SSI Bio, Amerika Birleşik Devletleri) içinde saklanan HGL5 insan granüloza hücreleri laminar akım kabini içinde 37 °C 'de su banyosu içinde çözüldü. Çözülen HGL5 hücrelerini içeren besiyeri 10 katına kadar komplet besiyeri ile tamamlanarak 1200 rpm (260 g) hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklatılarak pelet 1:1 oranında komplet besiyeri ve BIOAMF-1 besiyeri karışımı ile çözümlenerek T75 kültür kabına ekildi. Optimum kültür koşullarındaki nemli CO₂ inkübatörüne kadırıldı. Hücreler tutunduktan sonra besiyerleri gün aşırı olmak üzere komplet besiyeri ile değiştirildi. Hem primer granüloza hücreleri hem de HGL5 insan granüloza hücre hattı hücreleri 4. pasaja kadar çoğaltılarak deneyler için kullanıldı.

3.6. Kültür Hücrelerinin Kaldırılması, Pasajlanması ve Dondurulması

Ekilen hücreler faz kontrast mikroskobu (TMS Inverted Microscope, Nikon, Japonya) ile gözlemlendi. Kültür kabında %80 konfluensiye ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak 37 °C'ye ısıtılmış DPBS (Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg, Capricorn Scientific, Almanya) ile yıkandı. Tripsin (Tytripsin %2,5, Capricorn Scientific, Almanya) DPBS içinde 10 katına sulandırılarak %0,25 tripsin hazırlandı. Hücreler sonrasında en fazla 5 dakika olmak üzere önceden hazırlanmış ve 37 °C'ye ısıtılmış %0,25 tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı. Tripsin, komplet besiyeri içindeki FBS ile durdurularak karışım 1200 rpm (260g) hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet komplet besiyerinde çözüldü. 1:1 oranında komplet besiyeri ve Bioamf-1 ile yeni flasklara ekildi (Şekil 5). Pasaj numarası bir artırılarak etiket bilgileri not alındı.



Şekil 5: Hücrelerin pasajlanması.

Faz kontrast mikroskobu ile gözlem sırasında %80 çoğalma yoğunluğuna ulaşmış ve pasajlanmayacak hücreler %0,25'lik tripsin ile kaldırıldı. Santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve hücre peleti 700 µl DMEM-F12 besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonu kriyovial içine alındı. Üzerine 200 µl FBS (Fetal Bovine Serum, Collected in South America, Capricorn Scientific, Almanya) eklendi. Buz aküsü üzerine alınan kriyoviallere 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO, D2650, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) eklendi. Daha sonra kriyovialler dondurma kabına (BCS-136 CoolCell, Biocision, Amerika Birleşik Devletleri) alınarak -80 °C derin dondurucuya (DF290, Nüve, Türkiye) konuldu. Ertesi güne kadar derin dondurucuda bekleyen kriyovialler uzun süreli saklamak amacıyla sıvı azot tankına (-196 °C) alındı.

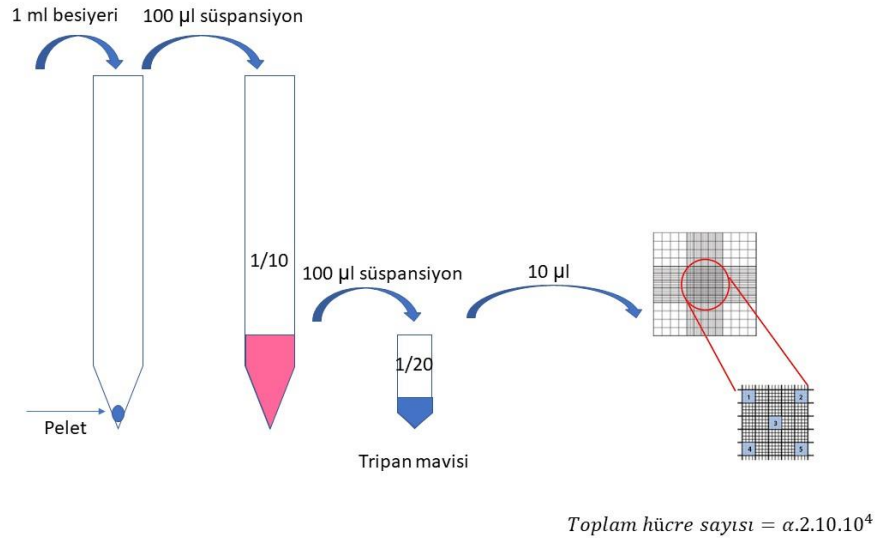
3.7. Kültür Hücrelerinin Sayılması

T25 ve T75 kültür kaplarında çoğaltılan hücreler besiyeri uzaklaştırılarak %0,25 tripsin ile kaldırıldı. FBS ile tripsin durdurulduktan sonra 1200 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak pelet 1 mL komplet besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak 1 mL'ye tamamlandı. Dilüe edilmiş hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak 100 µL tripan mavisi ile karıştırıldı. Hemositometre

lamına 10 µL süspansiyon konularak faz kontrast mikroskopunda 5 farklı alanda canlı hücreler sayıldı. Toplam hücre sayısı formülünde hesap edilerek toplam hücre sayısı belirlendi (Şekil 6).

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \alpha \cdot 2 \cdot 10 \cdot 10^4$$

α : Hemositometre lamında farklı alanlarda sayılan hücrelerin ortalaması .



Şekil 6: Kaldırılmış hücrelerin hemositometre lamında sayılması.

(α : hemositometre lamında farklı alanlarda sayılan hücrelerin ortalaması)

3.8. Uyarma Besiyerinin Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması

Kültüre edilen granüloza hücreleri FSH (follicle stimulating hormone) ve hCG (human chorionic gonadotropin) kullanılarak uyarıldı. FSH (Sigma, F4021-10UG, lot#MKCK7637, Amerika Birleşik Devletleri) ve hCG (Sigma, C1063-1VL, lot#SLBS9309, Amerika Birleşik Devletleri) liyofilize halde tedarik edildi. Hormonlar üretici önerileri doğrultusunda DPBS ile çözülerek steril 1,5 cc'lik konik dipli tüplere paylaştırıldı.

Bölünen çözeltiler üretici firmanın önerileri doğrultusunda -20 °C de dondurularak saklandı. Kültürdeki hücelere uygulanmak üzere dondurucudan çıkarılıp komplet besiyerinde hCG 10 IU/mL, FSH 0,5 IU/mL konsantrasyonda olacak şekilde taze çözülerek kullanıldı. Kontrol grubu, PKOS grubu ve HGL5 hücreleri hem immünfloresan işaretleme için hem de elektron mikroskopik inceleme için yeterli düzeyde çoğaldığında, içerisinde FSH 0,5 IU/mL, hCG 10 IU/mL derişiminde hormon bulunan komplet besiyeri ile 24 saat %5 CO₂, 37 °C' de nemli kültür inkübatöründe uyarıldı. Aynı anda uyarılmamış alt gruplar için sadece komplet besiyeri kullanıldı ⁹⁵.

3.9. İmmünfloresan İşaretleme için Gerekli Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması

3.9.1. Fosfat tamponu (PBS):

- Sodyum klorür (NaCl, 58,44 g/mol, Kimetsan, Türkiye)
- Potasyum klorür (KCl, 74,56 g/mol, potassium chloride extra pure, Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat (Na₂HPO₄*7H₂O, 268,03 g/mol di-Sodium hydrogen phosphate heptahydrate, Merck, Almanya)
- Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH₂PO₄*2H₂O, 156,01 g/mol Sodium di-hydrogen phosphate dihydrate, Merck, Almanya)

Hassas tartı üzerinde 80 g sodyum klorür, 2 g potasyum klorür, 107,212 g disodyum hidrojen fosfat heptahidrat, 15,6 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat tartıldı. Manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 ml distile su içinde çözüldü. Elde edilen 10X PBS tampon solüsyonu +4 °C de saklandı. Kullanmadan önce distile su ile 1X PBS tamponu yapılıp pH'ı 7,4'e ayarlanarak kullanıldı.

3.9.2. PBS-BSA solüsyonu hazırlanması:

PBS içinde %2 sığır serum albümini (Bovine Serum Albumi, $\geq 96\%$, Sigma, Almanya) hazırlandı. PBS-BSA solüsyonu taze hazırlanarak kullanıldı.

3.9.3 Serum blokajı solüsyonu:

PBS-BSA içinde %2 keçi serumu (Goat serum, Capricorn Scientific, Almanya) hazırlandı. Serum blokajı solüsyonu taze hazırlanarak kullanıldı.

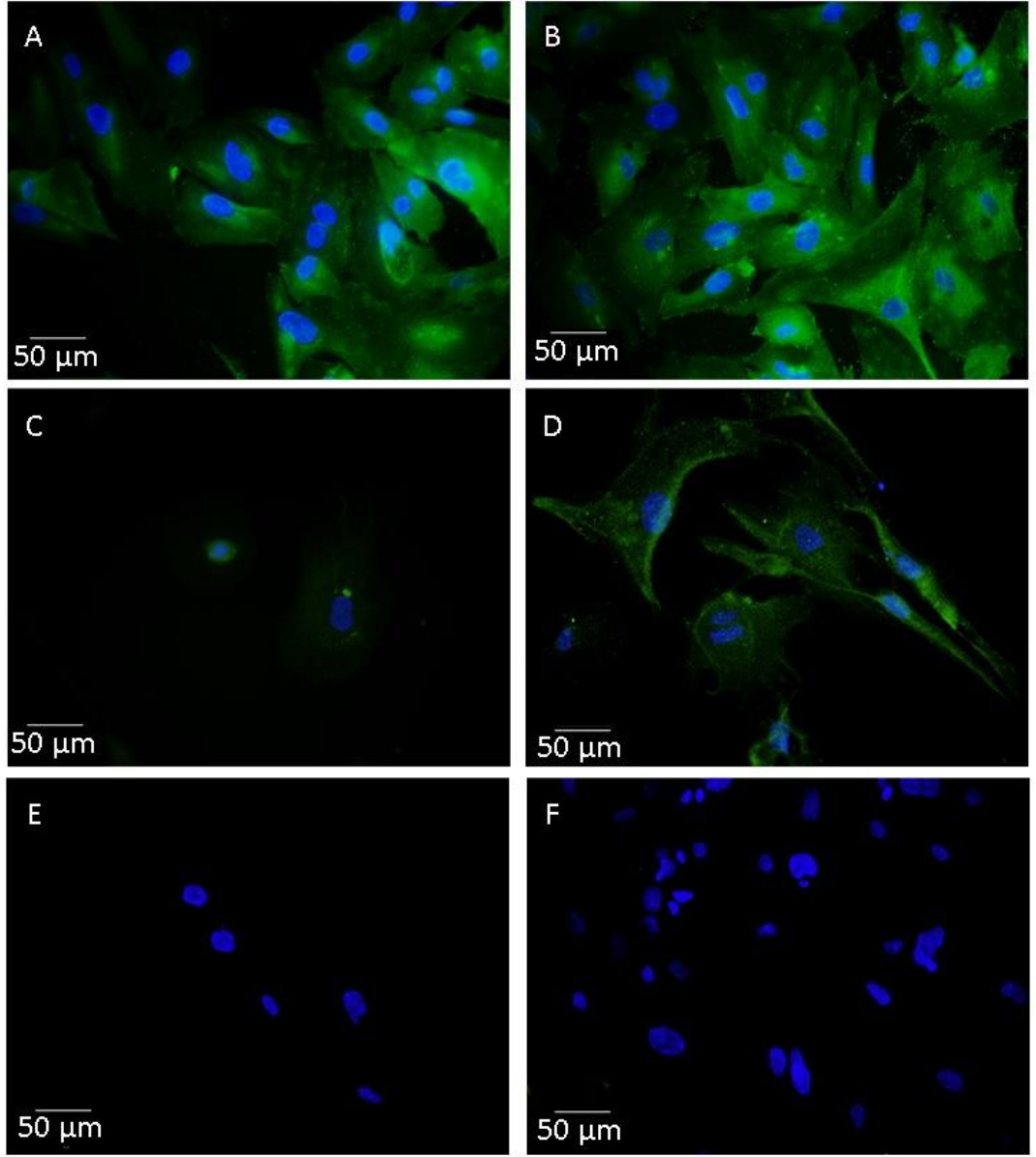
3.9.4. Primer antikorlar:

- FSHr antikor (FSH receptor Rabbit Polyclonal Antibody, cat: bs-0895R, Bioss Antibodies, Amerika Birleşik Devletleri)
- Stx6 antikor (Syntaxin 6 Rabbit Polyclonal Antibody, cat: bs-11261R, Bioss Antibodies, Amerika Birleşik Devletleri)
- KitL antikor (SCF Rabbit Polyclonal Antibody, cat: bs-0545R, Bioss Antibodies, Amerika Birleşik Devletleri)
- SNAP25 antikor (SNAP25 Rabbit Polyclonal Antibody, cat: bs-1131R, Bioss Antibodies, Amerika Birleşik Devletleri)
- StxBP1 antikor (STXBP1/Munc18 Rabbit Polyclonal Antibody, cat: bs-3954R, Bioss Antibodies, Amerika Birleşik Devletleri)

Primer antikorlar için 1/100, 1/200 ve 1/300 dilüsyonlarda ön deney yapıldı (Şekil 7). Uygun konsantrasyonun 1/300 olduğu görüldü. Primer antikorlar PBS-BSA içinde 1/300 dilüsyonda hazırlandı. Solüsyon taze hazırlanıp kullanıldı.

3.9.5. Floresan işaretli sekonder antikor:

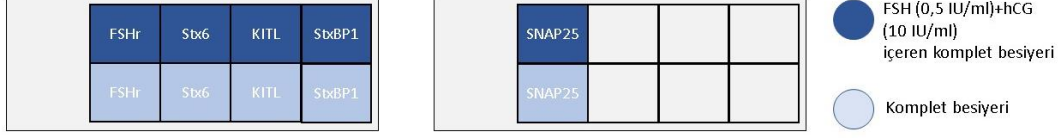
Sekonder antikor (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), cat: 111-545-144, Jackson ImmunoResearch, Amerika Birleşik Devletleri) primer antikorlara uygun olarak seçildi. 1/500, 1/800 ve 1/1000 dilüsyon oranlarında ön deney yapıldı (şekil 7). Uygun konsantrasyonun 1/1000 olduğuna karar verildi. Yeşil kanalda görüntülemeye uygun olarak Alexa Fluor® 488 (eksitasyon dalga boyu: 490 nm, emisyon dalga boyu:525 nm) konjuge olan sekonder antikor PBS-BSA içinde 1/1000 dilüsyonda kullanıldı. Taze hazırlanan solüsyon hemen kullanıldı. Çekirdek boyaması için DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) içeren kapatma ortamı (Antifade Mounting Medium with DAPI, VECTASHIELD®, cat: H-1200-10, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.



Şekil 7: Antikorlar için farklı antikor dilüsyonlarının belirlenmesi. A, FSHr işaretlemesi x40 büyütme, 1/100 primer antikor 1/500 sekonder antikor dilüsyonu. B, Stx6 işaretlemesi x40 büyütme, primer antikor 1/200, sekonder antikor 1/800 dilüsyonda. C, Stx6 işaretlemesi x40 büyütme, 1/100 primer antikor, 1/1000 sekonder antikor dilüsyonu. D, FSHr işaretlemesi x40 büyütme, 1/100 primer antikor, 1/1000 sekonder antikor dilüsyonu. E, sadece DAPI ile işaretlenmiş kontrol, x40 büyütme. F, primer antikorsuz kontrol, x40 büyütme. (Olympus IX73 floresan mikroskop, Olympus U-RFL-T ışık kaynağı, Japonya)

3.10. İmmünfloresan İşaretlemenin Uygulanması

En fazla 4 pasaja kadar çoğaltılan granüloza hücreleri kaldırıldıktan sonra immünfloresan işaretleme için 8 kuyucuklu steril lamlara (Cell Culture Slide 8well, SPL Life Sciences, Güney Kore) her kuyucuğa 4000 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. Hücrelerin tutunması için 24 saat inkübatörde kültüre edildi. Hücreler tutunduktan sonra besiyerleri; FSH ve hCG ile uyarılacak hücreler için uyarma besiyeri ile, diğer hücreler için ise komplet besiyeri ile değiştirildi. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılarak DPBS ile yıkandı. Metanol (Extra pure methanol, Merck, Almanya) ile 24 °C'de 5 dakika tespit edildi. PBS ile 3 kez yıkandı. Oda sıcaklığında 10 dakika %0,1 Tween20 (Sigma, Almanya) ile permeabilizasyon yapıldı. PBS ile 3 kez yıkandı. Oda sıcaklığında 1 saat serum blokajı yapıldı. Primer antikorlar ile (1/300 dilüsyonda) 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi (Şekil 8). PBS ile 3 kez yıkandı. Sekonder antikor (1/1000 dilüsyonda) ile bir saat oda sıcaklığında bekletildi. DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate, cat: 422801, BioLegend, Amerika Birleşik Devletleri) ile çekirdekler boyanarak kapatma medyumunu ile kapatıldı. Floresan mikroskopta (Leica DM6B microscope, DFC7000T camera, Almanya) yeşil ve mavi kanalda görüntülendi ve değerlendirildi. Floresan ışımaya yoğunluğunun sayısallaştırılması için görüntülerin ham verileri Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından sağlanan ImageJ görüntü analiz yazılımı ile incelendi. Sayısallaştırma işlemi için yalnızca yeşil kanalın ham görüntülerinde ölçüm yapıldı. Her hücrenin sınırı dahilindeki alanın ortalama ışımaya yoğunluğu ölçüldü ve zemin ışımaya yoğunluğu çıkarılarak analiz edildi.



Şekil 8: Primer antikoların 8 kuyucuklu lamdaki yerleri.

3.11. Elektron Mikroskopik İncelemenin Uygulanması

3.11.1. Elektron Mikroskopi İçin Hücrelerin Tespiti

Kontrol, PKOS ve HGL5 gruplarından hücreler T25 kültür kabında çoğaltıldı. Çoğalan hücreler uyarma besiyeri ve komplet besiyeri ile 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra %0,25 tripsin ile kaldırılan hücreler 1200 rpm hızında (260 g) 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet, fosfatlı tampon solüsyonu içinde hazırlanmış %1 glutaraldehit (Glutaraldehyde, 25% Aqueous Solution, Merck, Almanya) ile oda sıcaklığında 30 dakika tespit edildi. Ardından hücreler 1200 rpm hızında (260 g) 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak %2 glutaraldehit ile oda sıcaklığında 30 dakika daha tespit edildi. Glutaraldehit ile tespitten sonra üç kez fosfat tamponu ile 1200 rpm hızında (260 g) 5 dakika santrifüj edilerek glutaraldehit uzaklaştırıldı. Glutaraldehit uzaklaştırıldıktan sonra distile su içinde hazırlanmış %1 ozmiyum tetroksit (Osmium Tetroxide, 1g crystal, EM grade, cat: 18456, Ted Pella, İsveç) ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat ikincil tespiti yapıldı. Ozmiyum tetroksit ile tespitten sonra üç kez fosfatlı tampon solüsyonu ile 1200 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilerek ozmiyum tetroksit uzaklaştırıldı.

3.11.2. Hücre Peletinin Agara Gömülmesi

Birincil ve ikincil tespitleri yapılan hücre peletleri takip ve araldite gömme için önce agara gömüldü. Bu amaçla distile su içinde kaynatılarak %2 agar hazırlandı. Rodajsız düz lamalar 60 °C kuru etüv içinde ısıtıldı. Tespiti tamamlanmış hücreler 1200 rpm hızında (260 g) 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atılarak hücre peleti küret yardımıyla santrifüj tüpünden alındı. Isıtılmış lam üzerine agar konuldu. Hücre peleti hazırlanan agara gömüldü. Agar donduktan sonra 1 mm³ büyüklüğünde kesilerek fosfat tamponuna alındı.

3.11.3. Örneklerin Elektron Mikroskopi İçin Takibi

Tespiti yapılmış ve agara gömülmüş hücreler;

- %50 etanol ile 10 dakika
- %60 etanol ile 10 dakika
- %70 etanol ile 10 dakika
- %80 etanol ile 10 dakika
- %96 etanol ile 15 dakika
- %96 etanol ile 15 dakika
- %100 etanol ile 20 dakika
- %100 etanol ile 20 dakika

olacak şekilde oda sıcaklığında dehidrate edildi. Dehidratasyonu tamamlanan hücreler iki kez 15'er dakika olmak üzere propilen oksit (Propenoxid %99, Acros Organics, Thermo Fisher Scientifics, Amerika Birleşik Devletleri) ile araldite alıştırıldı.

İnfiltrasyon ve gömme için araldit (Araldite 6005 embedding kit, cat: #13920, Electron Microscopy Sciences, Amerika Birleşik Devletleri);

- Araldite 6005.....20 ml
- Dodesenil süksinik anhidrit (DDSA).....27 ml
- Benzil dimetilamin (BDMA).....1,4 ml

ölçüleriyle hazırlandı.

İnfiltrasyon için üç ölçü propilen oksit ile bir ölçü plastik karıştırılarak hücreler 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra bir ölçü propilen oksit ile bir ölçü plastik karışımında 1 saat, sonra bir ölçü propilen oksit ile üç ölçü plastik karışımında bir gece bekledi.

3.11.4. Örneklerin Araldite Gömülmesi

Ertesi gün araldite gömme işlemi için hücreler infiltrasyon solüsyonundan alındı. Plastik içinde 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler gömme kalıbına (flat embedding mold, single end, Pelco 105, Ted Pella, İsveç) gömüldü. 48 saat 60 °C kuru etüvde (EN 500, Nüve, Türkiye) polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra soğuyan etüvden hücre blokları alındı.

3.11.5. Hücre Bloklarından Kesit Alınması

Plastik bloklar trimlendi. Mikrotomda (Leica RM2265, Almanya) 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. İnce kesiti alınacak alanlar ışık mikroskobu altında belirlendi. İnce kesit mikrotomunda 60 nm kalınlığında alınan kesitler bakır gridlere (EMS grid 200 square mesh, cat: EMS200-Cu, Electron Microscopy Sciences, Amerika Birleşik Devletleri) yüklenerek kontrastlama işlemine geçildi.

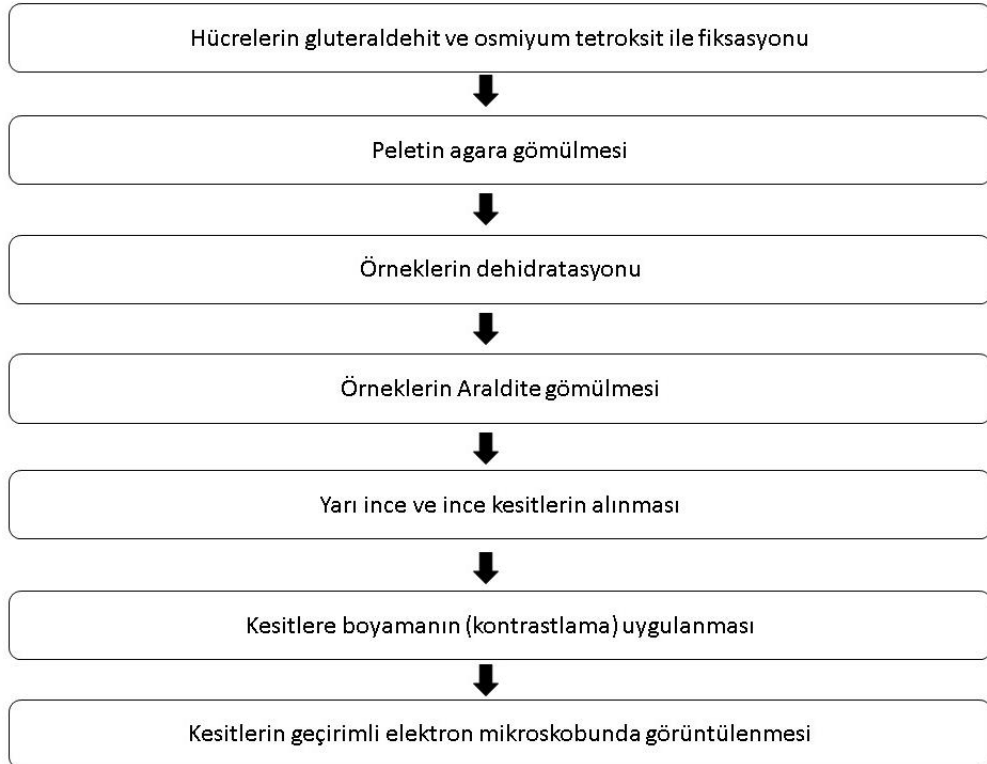
3.11.6. Kesitlere Boyamanın Uygulanması

Bakır gridlere yüklenen kesitler kontrastlama cihazı (Leica EM AC20, Almanya) ile kontrastlandı. Boyama için kurşun sitrat (Ultrastain 2, lead citrate %3, Leica, Almanya) ve uranyl asetat (Ultrastain 1, uranyl acetate %0,5, Leica, Almanya) kullanıldı.

3.11.7. Kesitlerin Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskopunda İncelenmesi ve Görüntülenmesi

Kontrastlanan kesitler bakır grid üzerinde transmisyon elektron mikroskopunda dijital kamera ile (Jeol JEM 1400, Japonya; Gatan Inc., Amerika Birleşik Devletleri) görüntülendi.

Tablo 5: Elektron mikroskopik inceleme için akış şeması.



3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler ve verilerin görselleştirilmesi için G*Power 3.1.9.7 ve lisansı Hacettepe Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığı tarafından sağlanan SPSS versiyon 23 yazılımı kullanıldı. Çalışma için ihtiyaç duyulan örneklem genişliği parametrik testlere göre hesaplandı. Gruplardan elde edilen ifade düzeylerinin değişkenliğinin 0,5 birim olduğu ve ifade düzeylerindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının parametrik yöntemler ile inceleneceği öngörülerek güç analizi yapıldı ve örneklem genişliği belirlendi. Bu öngörüler altında %80 güç %5 tip-1 hata ile her bir deney grubuna 10 katılımcının dahil edilmesine karar verildi.

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram, olasılık grafikleri ve Shapiro-Wilk testleri kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı istatistikler normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve çeyrekler arası genişlik kullanılarak verildi. İki bağımsız grubun karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İki'den fazla bağımsız grubun karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testinden sonra Bonferroni düzeltmesi yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar ile gruplar arası fark değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak alındı. Değişkenler arasında korelasyonun değerlendirilmesi için Spearman testi kullanıldı. Tip-1 hata düzeyi %5 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

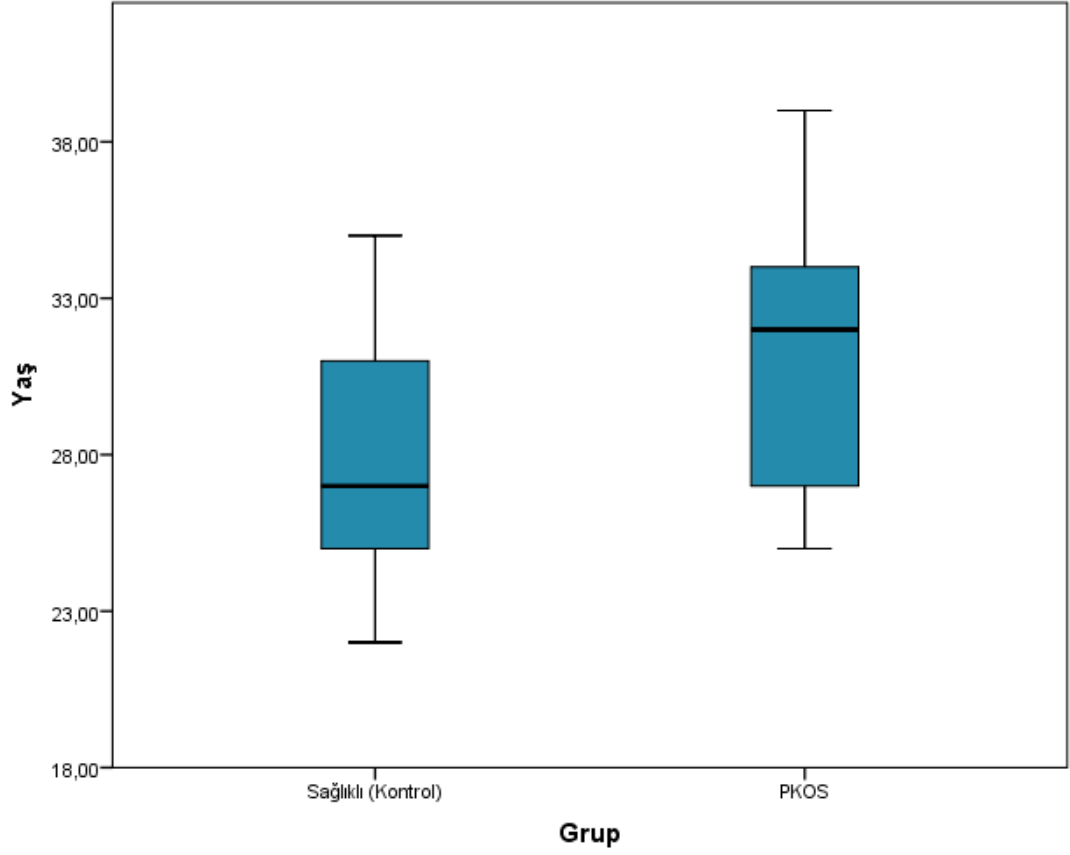
4.1. Katılımcıların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza üremeye yardımcı tedavi için ÜYTE kliniğine başvuran ve Rotterdam kriterlerine göre klinik olarak polikistik over sendromu tanısı alan kadınlar ile; erkek faktörü nedeniyle ÜYTE tedavisine alınmış sağlıklı kadınlar dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 20 katılımcının 10'u sağlıklı kadınlardan, 10'u ise polikistik over sendromu tanısı almış kadınlardan oluşturuldu. Başka patolojileri bulunan bireyler çalışmamıza katılımcı olarak dahil edilmedi. Katılımcılar vücut kitle indeksi 18,5-24,9 kg/m² aralığında⁹² olan bireylerden seçildi. Kontrol grubunun yaş ortancası 27 olarak saptandı. PKOS grubunun yaş ortancası ise 32 olarak görüldü (Tablo 6). Her iki grubun yaş dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,068, Mann-Whitney Testi) (Tablo 7).

Tablo 6: PKOS ve kontrol grubu katılımcıların yaşlarına ilişkin sayısal veriler.

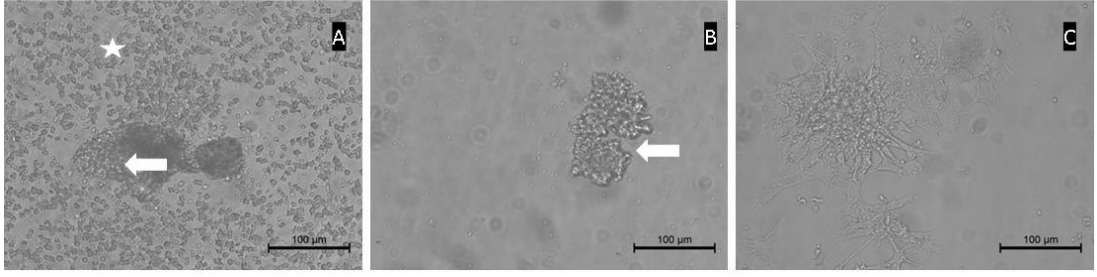
	Hasta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	En Küçük Değer	En Büyük Değer	P değeri
Kontrol	10	27,4	4,087	27	22	35	0,068
PKOS	10	31,4	4,623	32	25	39	

Tablo 7: PKOS ve kontrol grubu katılımcılarına ait yaşların kutu çizgi grafiği.



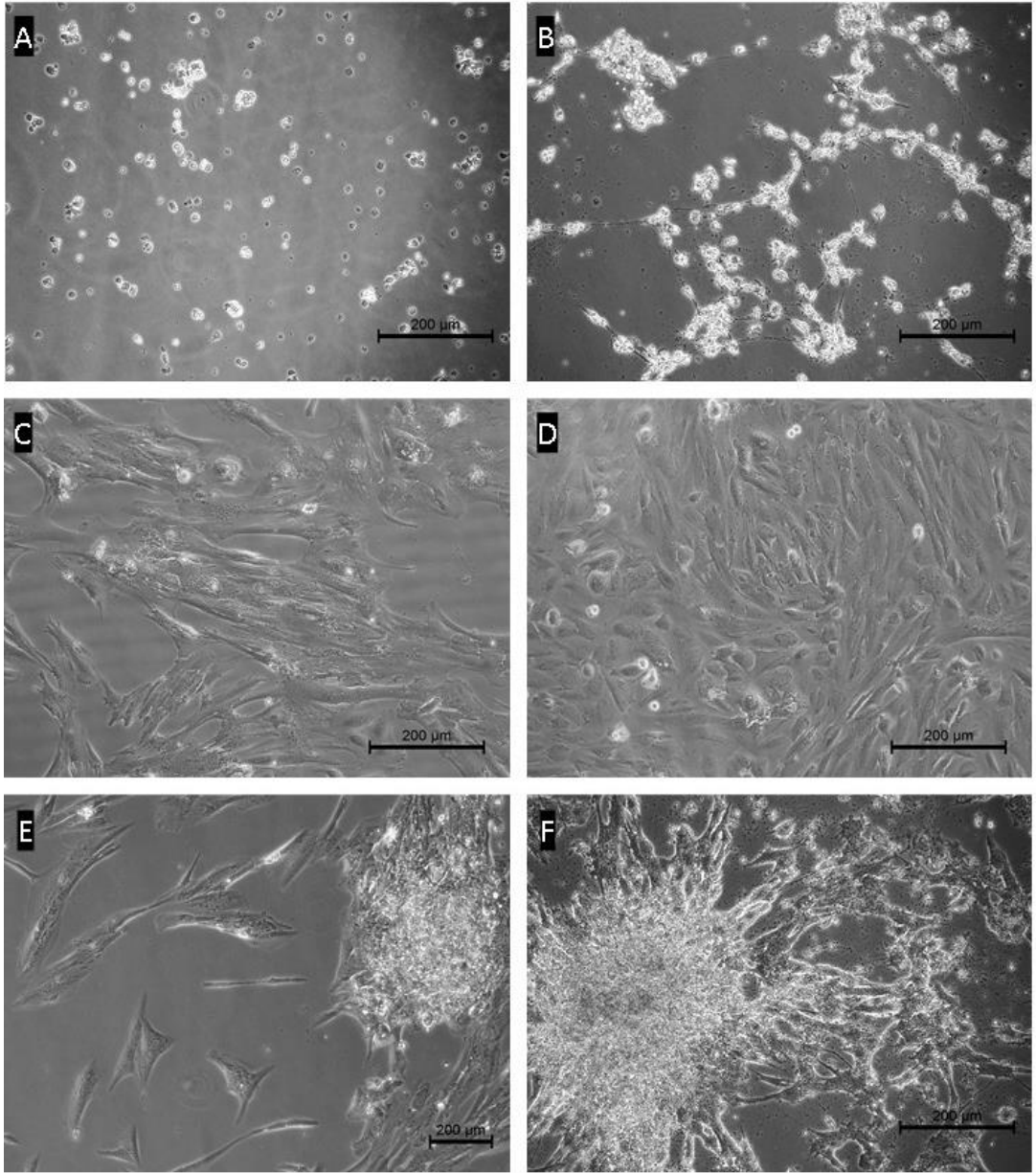
4.2. Kültüre Edilen Hücrelerin Faz Kontrast Mikroskopunda İncelenmesi

Gruplardaki farklı bireylere yapılan ovulasyon indüksiyonu sonucunda farklı sayılarda folikül gelişimi gözlenmiştir. Bu nedenle OPU işlemi sırasında elde edilen atık folikül sıvısı miktarı da değişkenlik göstermiştir. Folikül sıvıları laboratuvarımız bünyesinde oluşturulan ve geliştirdiğimiz granüloza hücresi izolasyonu metodu⁹⁴ ile izole edildi ve kan hücrelerinden ayrıştırıldı. İzolasyonu takiben kültür kabına ekilen hücrelerin 48. saatte tamamen tutunduğu görüldü (Şekil 9).



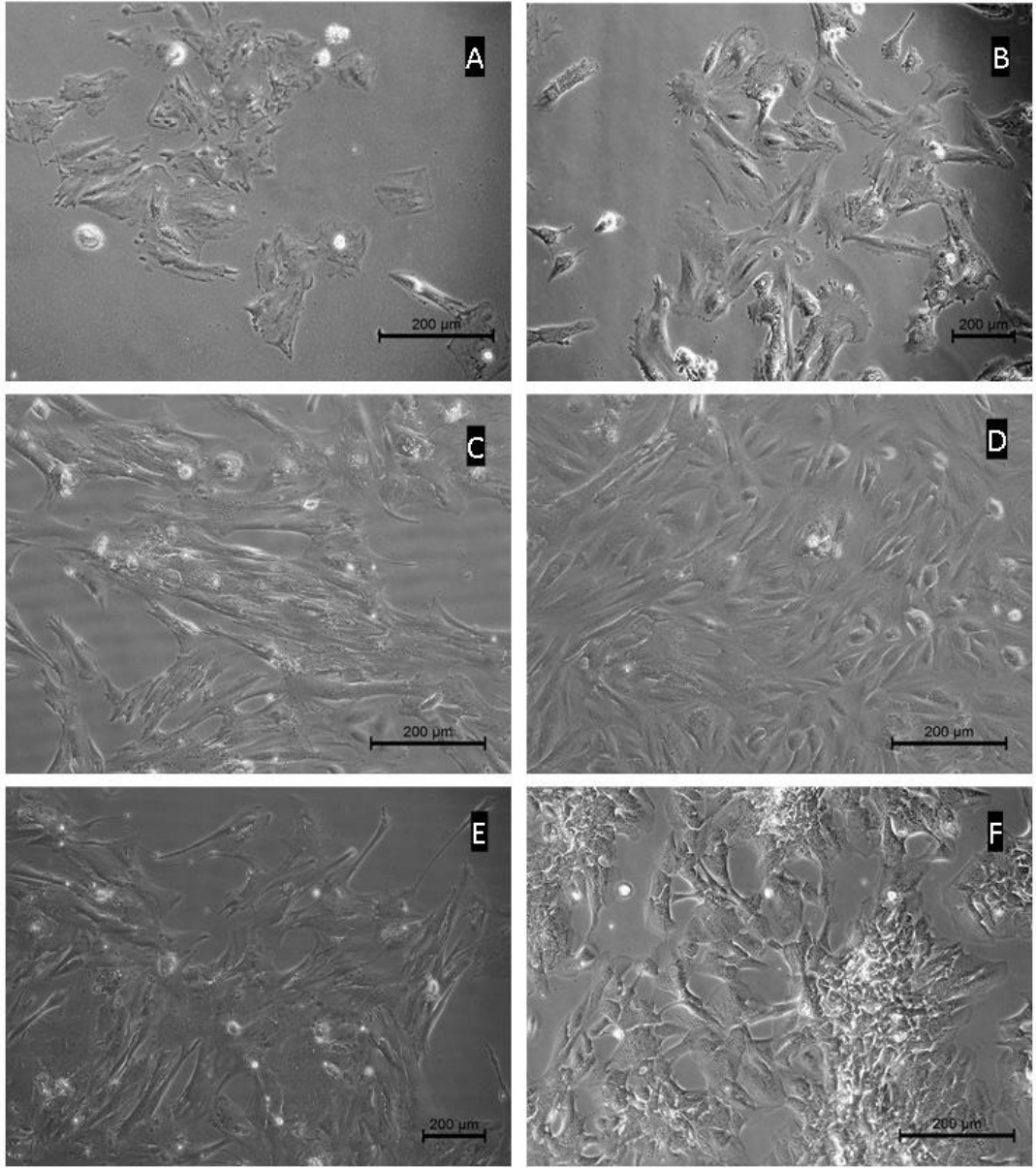
Şekil 9: İnsan folikül sıvısından primer granüloza hücresinin izolasyon süreci. **A:** İzolasyon öncesi folikül sıvısının faz kontrast mikrografı. Beyaz ok granüloza hücresi kümesini, beyaz yıldız ise eritrositleri ve diğer kan hücrelerini göstermektedir. **B:** İzolasyon sonrası granüloza hücrelerinin faz kontrast mikrografı, zeminde kan hücreleri görülmemektedir. **C:** İzolasyon sonrası 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilen tutunmuş granüloza hücrelerinin 48. Saatteki faz kontrast mikrografı. (Mikrograflar x20 objektif büyütmesinde çekilmiştir.)

Sağlıklı (erkek faktörü, kontrol) kadınlardan ve PKOS'lu kadınlardan izole edilen granüloza hücrelerinin primer kültüründe; tutunmuş küme odakları halinde hücre toplulukları ve tutunmuş tek tek hücreler şeklinde olduğu izlendi. İlerleyen günlerde tutunan granüloza hücre kümelerinden çevreye doğru yeni hücrelerin de tutunarak dağıldığı ve proliferere olduğu görüldü (Şekil 10). Çoğaltma sırasında 4 subkültürden daha fazla pasaj yapılmadı. Hücrelerin faz kontrast mikroskobundaki morfolojik özellikleri ile tutunma ve çoğalma karakterleri hem gruplar arasında hem de grup içindeki farklı katılımcılar arasında birbirine benzerdi.

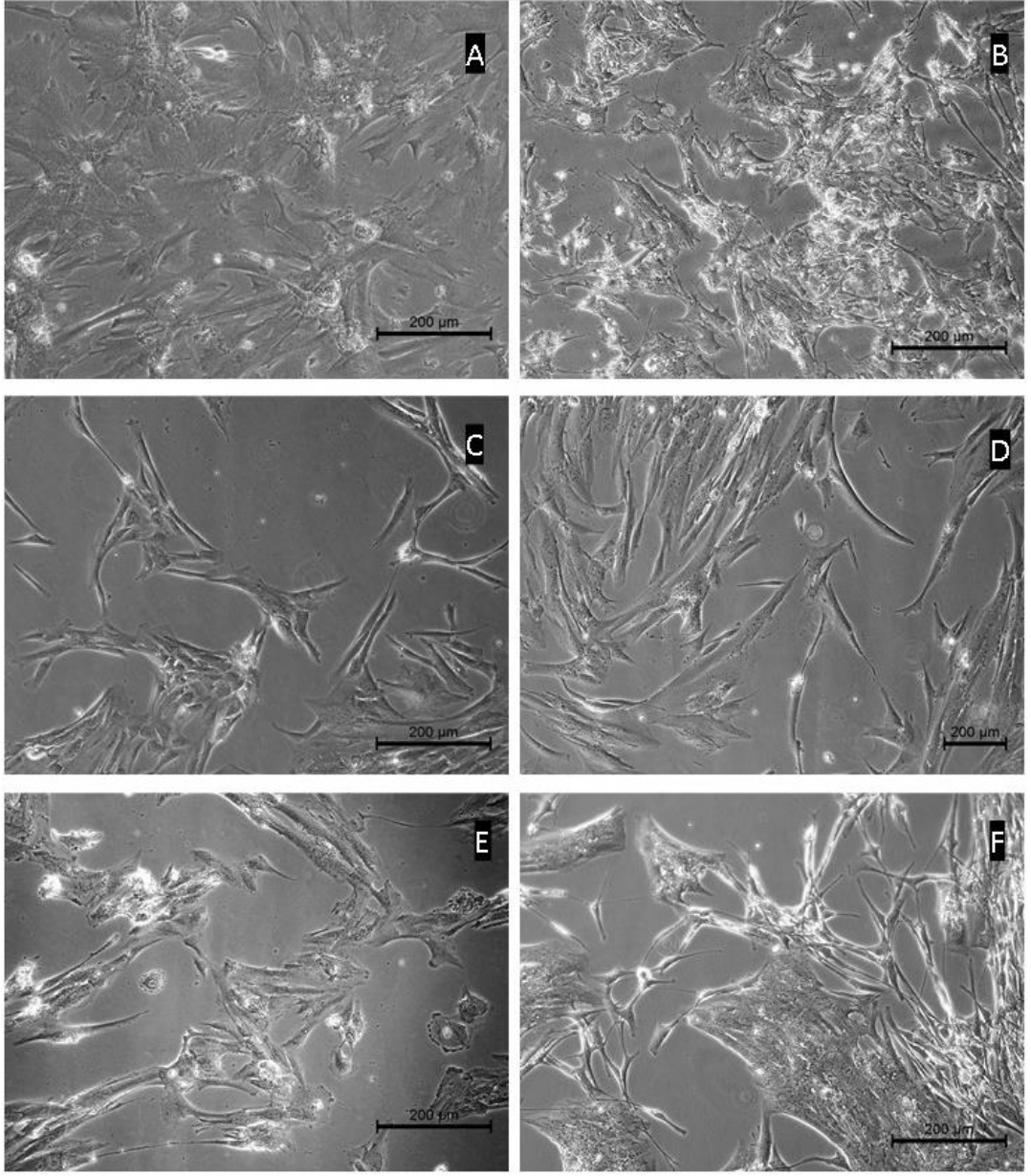


Şekil 10: Primer granüloza hücre kültürünün faz kontrast mikrografları. **A:** Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Henüz tutunmadıkları görülmektedir. **B:** Primer kültürde 8. saat granüloza hücreleri. **C:** Primer kültürde 72. saat granüloza hücreleri. **D:** Primer kültürde 2. hafta granüloza hücreleri. **E:** Primer kültürde küme şeklinde tutunan granüloza hücrelerinin 24. saat mikrografları. **F:** Primer kültürde küme şeklinde tutunan granüloza hücrelerinin 72. saat mikrografları. Granüloza hücresi kümesinden çevreye doğru çoğalarak yayılan hücreler görülmektedir.

Sağlıklı (erkek faktörü, kontrol grubu) kadınlardan ve PKOS'lu kadınlardan alınan granüloza hücreleri kültür ortamında faz kontrast mikroskopunda incelendiğinde epiteloid tipte hücreler görüldü. Hücreler kültür kabına uzantılar geliştirerek tutundular. Uzantıları ile birbirlerine temas noktaları oluşturma eğilimi gösterdiler. Farklı bireylerden izole edilerek çoğaltılmış hücreler birbirleri arasında benzer morfolojik özellikler gösterdiler (Şekil 11, Şekil 12).

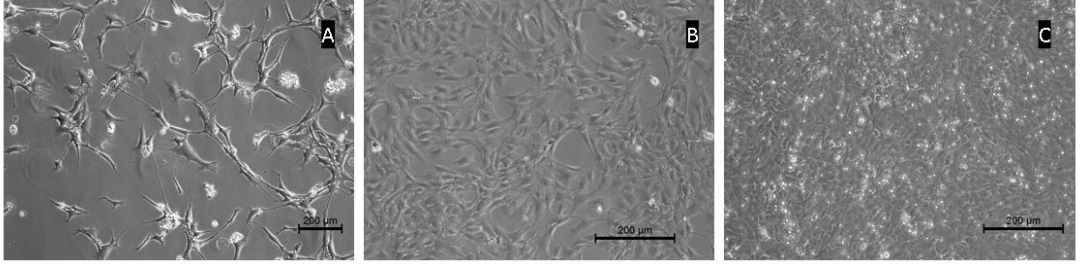


Şekil 11: Sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde primer kültür mikrografları. Gruptaki farklı bireylerden çekilmiş faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Kültür hücrelerinin morfolojileri homojen özellik göstermektedir. Hücreler uzantıları ile temas kurma eğilimi göstermiştir.



Şekil 12: PKOS tanısı alan kadınların granüloza hücrelerinde primer kültür mikrorafları. Gruptaki farklı bireylerden çekilmiş faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Hücreler morfolojik olarak homojen özellik göstermektedir. Hücrelerin sitoplazmik uzantıları ile temas kurma eğilimi bulunduğu ve birbirleri ile birçok noktada kontakt kurdukları izlendi.

HGL5 hücre hattı ile yapılan kültürde hücrelerin morfolojik yapıları epiteloid görünümlüydü. Homojen hücre dağılımı izlendi. Yapılan kültürde HGL5 hücreleri tam konfluensiye kısa sürede ulaştıkları için epiteloid hücrelerin tipik kaldırım taşı görünümü de izlendi (Şekil 13).



Şekil 13: HGL5 insan granüloza hücre hattı hücrelerinin faz kontrast mikroskopunda çekilmiş mikrografıları. A: HGL5 hücreleri 8. saat mikrografı. B: HGL5 hücreleri 24. saat mikrografı. C: HGL5 hücreleri 48. saat mikrografı.

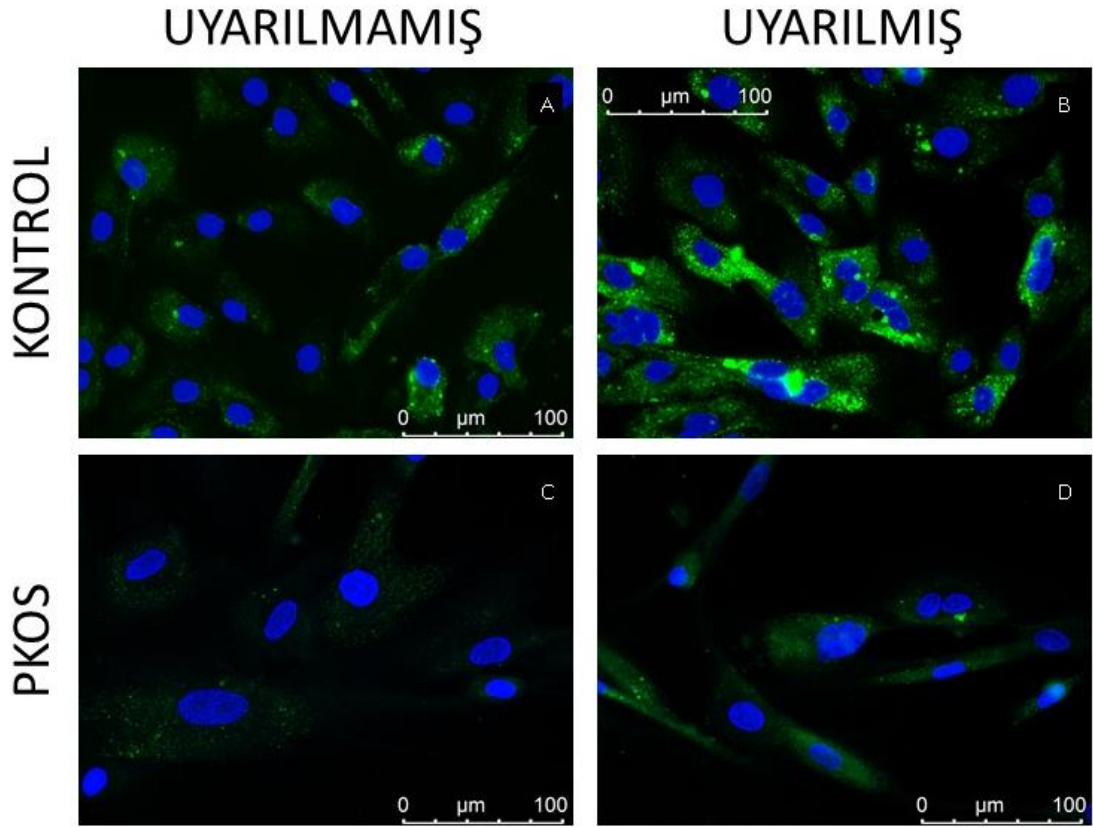
4.3. İmmüno Floresan İşaretlemenin Değerlendirilmesi

4.3.1. FSHr İmmüno Floresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi

Kontrol (sağlıklı, erkek faktörü) ve PKOS grubunda hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda FSHr ifadesi izlendi. Uyarılmış koşullarda FSHr işaretlenme paterni hücrenin merkezine doğru sitoplazmada yoğunlaşmıştı (reseptör internalizasyonu). Ayrıca FSH-hCG ile uyarılmış hücrelerde yoğun FSHr immün işaretlenmesi tespit edildi. PKOS grubunda reseptör internalizasyona uyumlu işaretlenme kontrol grubundakine benzer değildi. PKOS grubunda hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda FSHr işaretlenmesi kontrol grubu kadar yoğun gözlenmedi (Şekil 14).

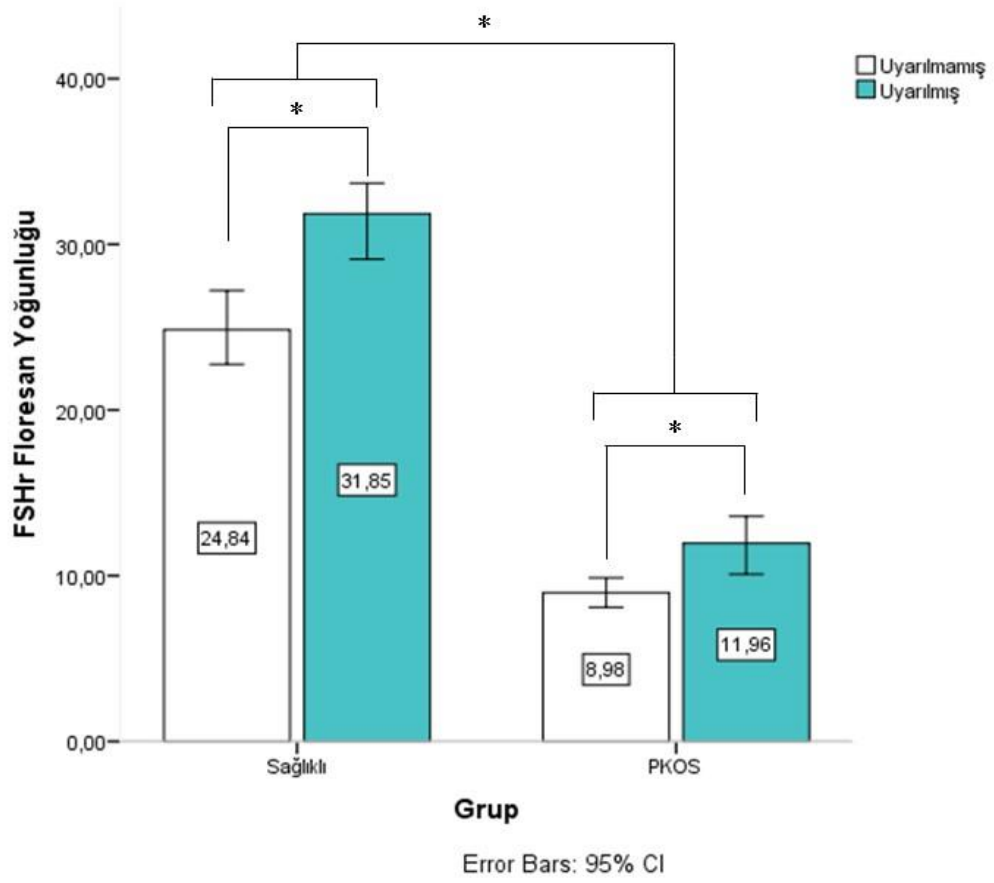
FSH reseptörünün granüloza hücrelerindeki ifadesi immüno floresan ışına yoğunlukları ile değerlendirildi. Kontrol (sağlıklı, erkek faktörü) grubunda FSHr düzeylerinin uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda PKOS grubundan daha yüksek olduğu tespit edildi (Mann-Whitney Testi, $p < 0,001$). FSH 0,5 IU/ml ve hCG 10 IU/ml

ile granüloza hücrelerine yapılan uyarımın, hem sağlıklı (Mann-Whitney Testi, $p < 0,001$) hem de PKOS'lu (Mann-Whitney Testi, $p = 0,002$) kadınların hücrelerinde FSHr ifadelerini artırdığı görüldü (Tablo 8, Tablo 9).



Şekil 14: Granüloza hücrelerinde FSHr immünfloresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi.

Tablo 8: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde FSHr immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.



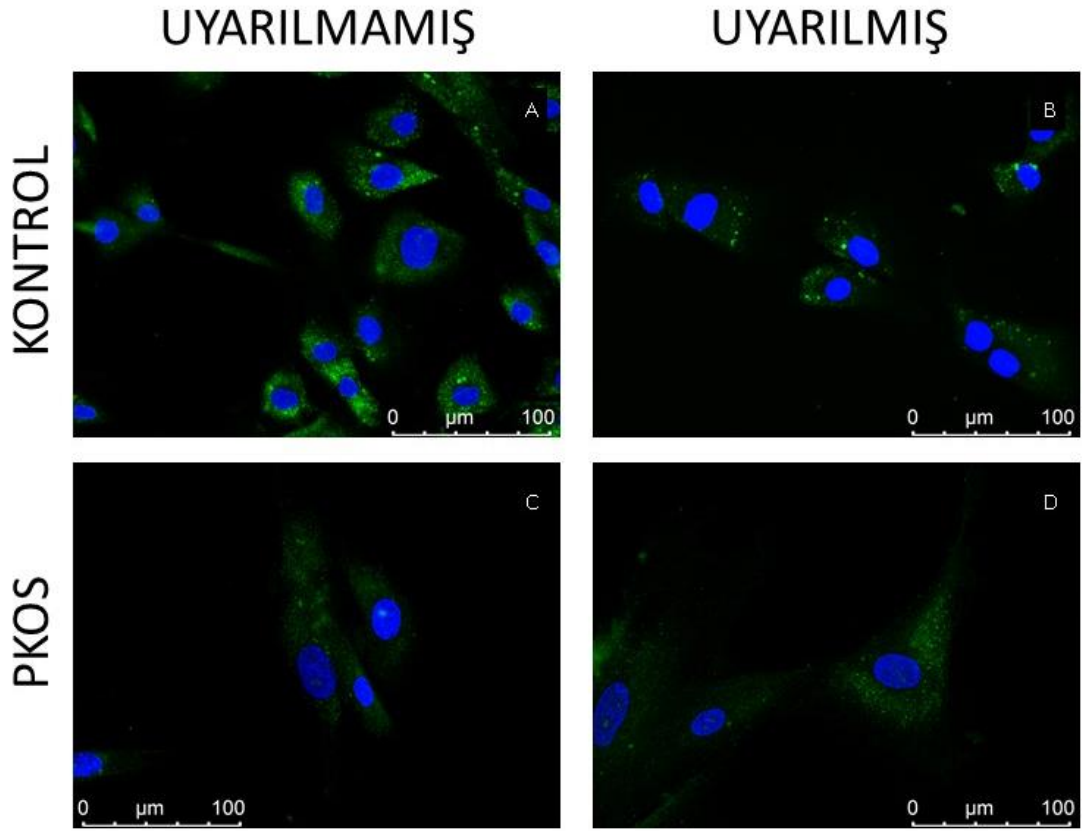
Tablo 9: FSHr yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Grup	Ortanca	Çeyrekler arası genişlik	p değeri
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	24,8350	15,83	<0,001*
PKOS uyarılmamış	8,9760	8,00	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	24,8350	15,83	<0,001*
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	31,8495	19,15	
PKOS uyarılmamış	8,9760	8,00	0,002*
PKOS uyarılmış	11,9570	10,52	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	31,8495	19,15	<0,001*
PKOS uyarılmış	11,9570	10,52	

4.3.2. Stx6 İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi

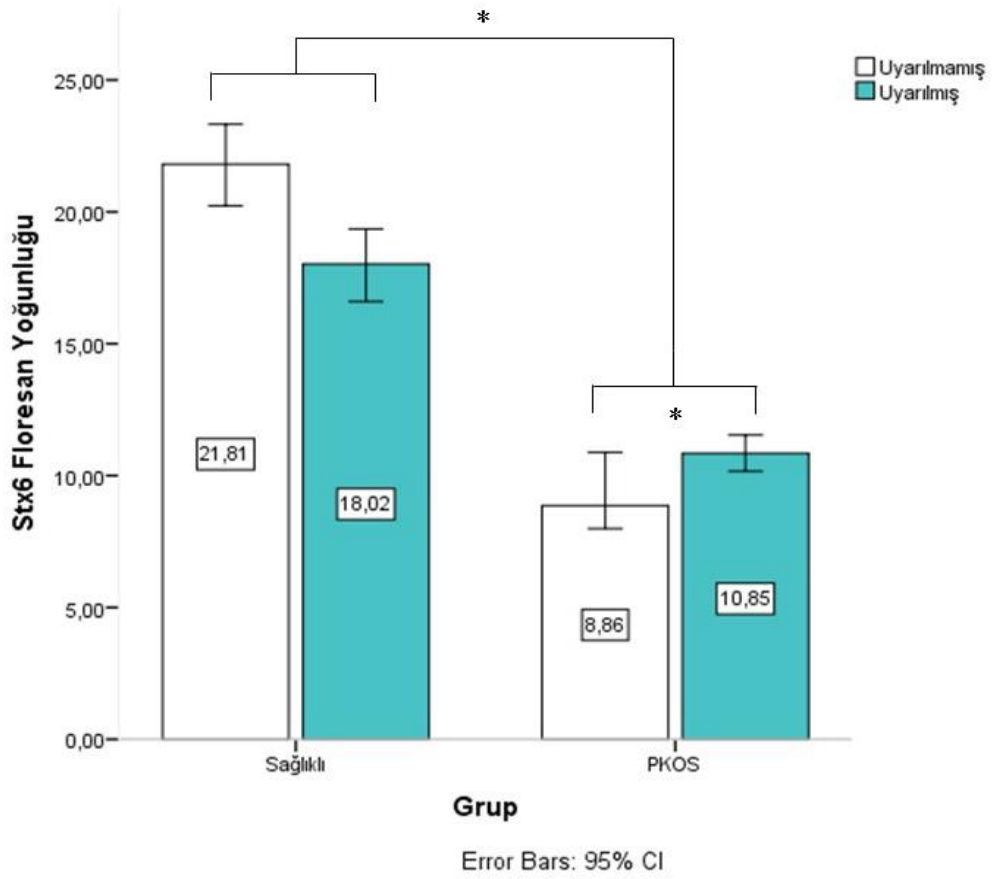
Stx6 proteini için hem kontrol (sağlıklı) hem de PKOS gruplarında uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda granüler işaretlenme gözlemlendi. Stx6 protein işaretlemesi kontrol grubunda uyarılmamış koşullarda çekirdek etrafındaki sitoplazmada yoğunlaşmış olarak görüldü. FSH-hCG uyarısıyla kontrol grubundaki Stx6 yerleşimi hücre periferine doğru dağıldı. PKOS grubunda böyle bir dağılım görülmedi (Şekil 15).

Stx6 proteinin granüloza hücrelerindeki immünfloresan yoğunluğu değerlendirildi. Stx6 düzeyleri sağlıklı kadınlardan alınan granüloza hücrelerinde PKOS'a göre daha yüksekti (Mann-Whitney Testi, $p < 0,001$). Sağlıklı hücrelerde FSH-hCG uyarısı Stx6 floresan yoğunluğu düzeylerini azalttı ancak istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (Mann-Whitney Testi, $p = 0,015$). PKOS grubunda FSH-hCG uyarısı ile Stx6 immünfloresan yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı yükseldi (Mann-Whitney Testi, $p = 0,003$) (Tablo 10, Tablo 11).



Şekil 15: Granüloza hücrelerinde Stx6 immün floresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi.

Tablo 10: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde Stx6 immunfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.



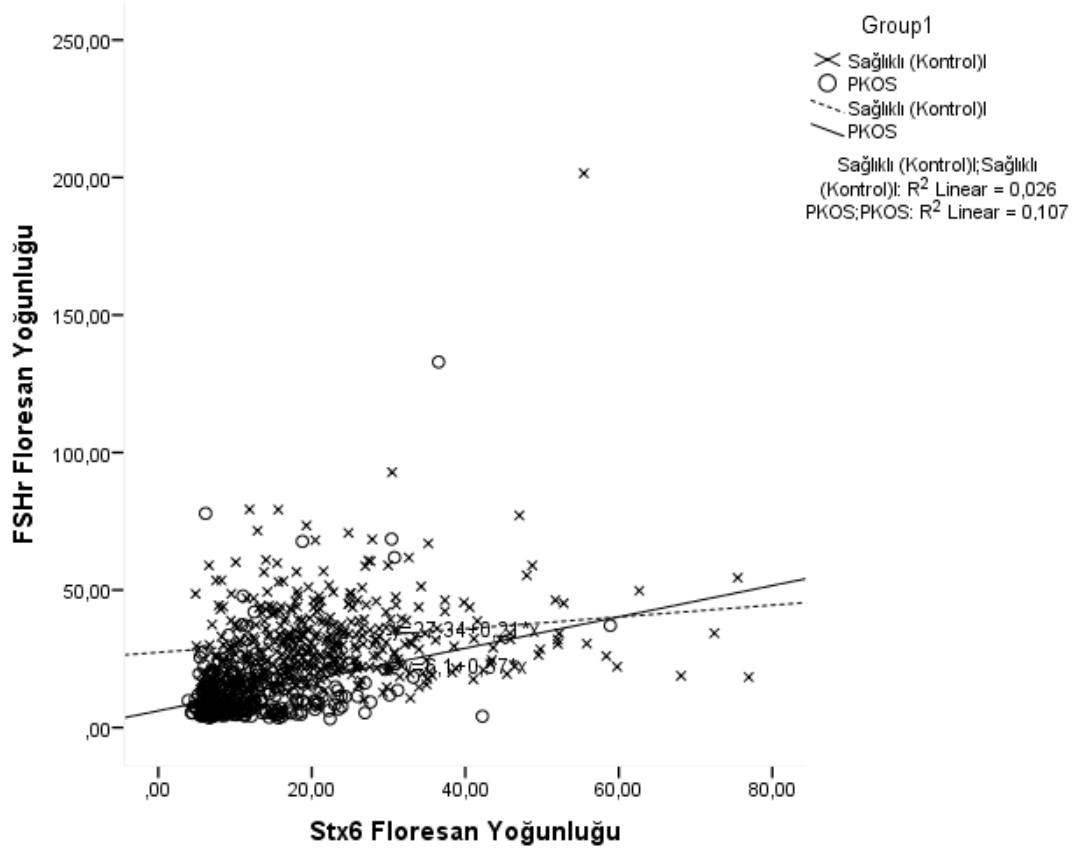
Tablo 11: Granüloza hücrelerinde ölçülen Stx6 immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri.

* istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Grup	Ortanca	Çeyrekler arası genişlik	p değeri
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	21,8075	11,71	<0,001*
PKOS uyarılmamış	8,8610	8,20	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	21,8075	11,71	0,015
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	18,0220	13,70	
PKOS uyarılmamış	8,8610	8,20	0,003*
PKOS uyarılmış	10,8460	8,20	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	18,0220	13,70	<0,001*
PKOS uyarılmış	10,8460	8,20	

Stx6 düzeylerinin her iki grupta da FSHr ile korelasyon analizi yapıldığında kontrol ve PKOS gruplarında pozitif yönde zayıf korelasyon gözlemlendi (Spearman Korelasyon Testi). Kontrol grubunda korelasyon katsayısı 0,133 ($p=0,008$), PKOS grubunda ise korelasyon katsayısı 0,228 ($p<0,001$) olarak hesaplandı (Tablo 12).

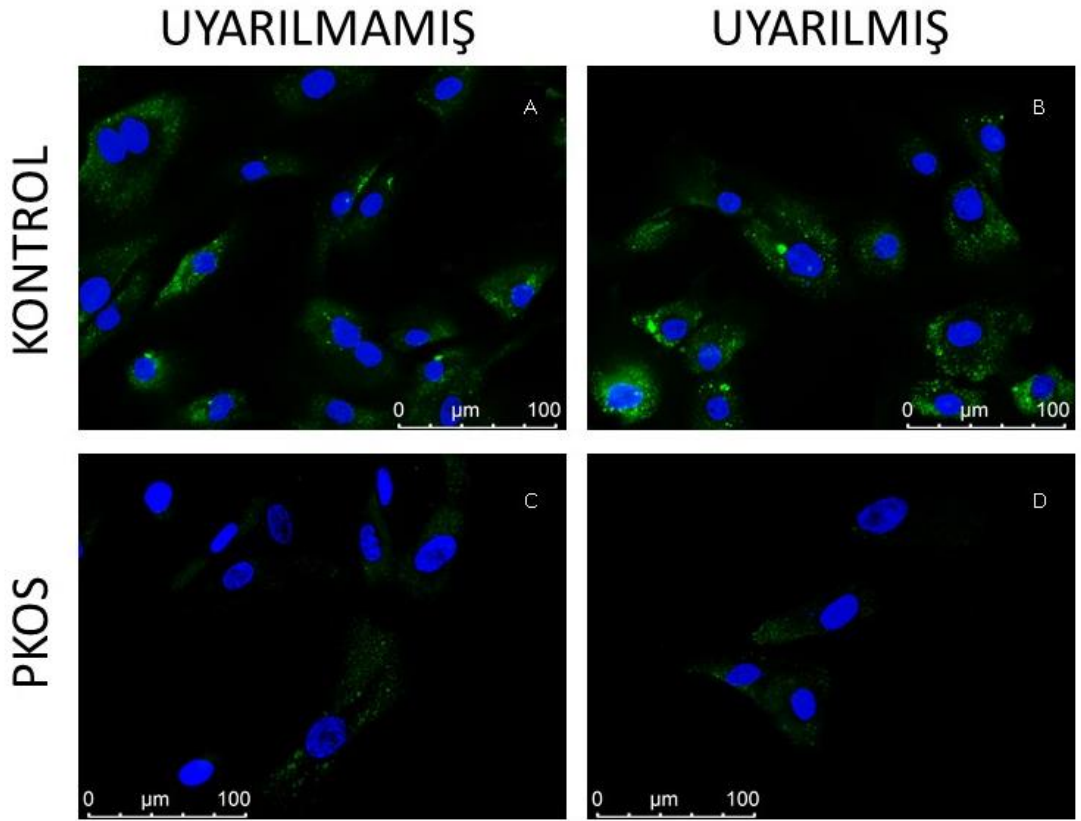
Tablo 12: FSHr ve Stx6 floresan yoğunlukları arasındaki korelasyon grafiği.



4.3.3. SNAP25 İmmünlüresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi

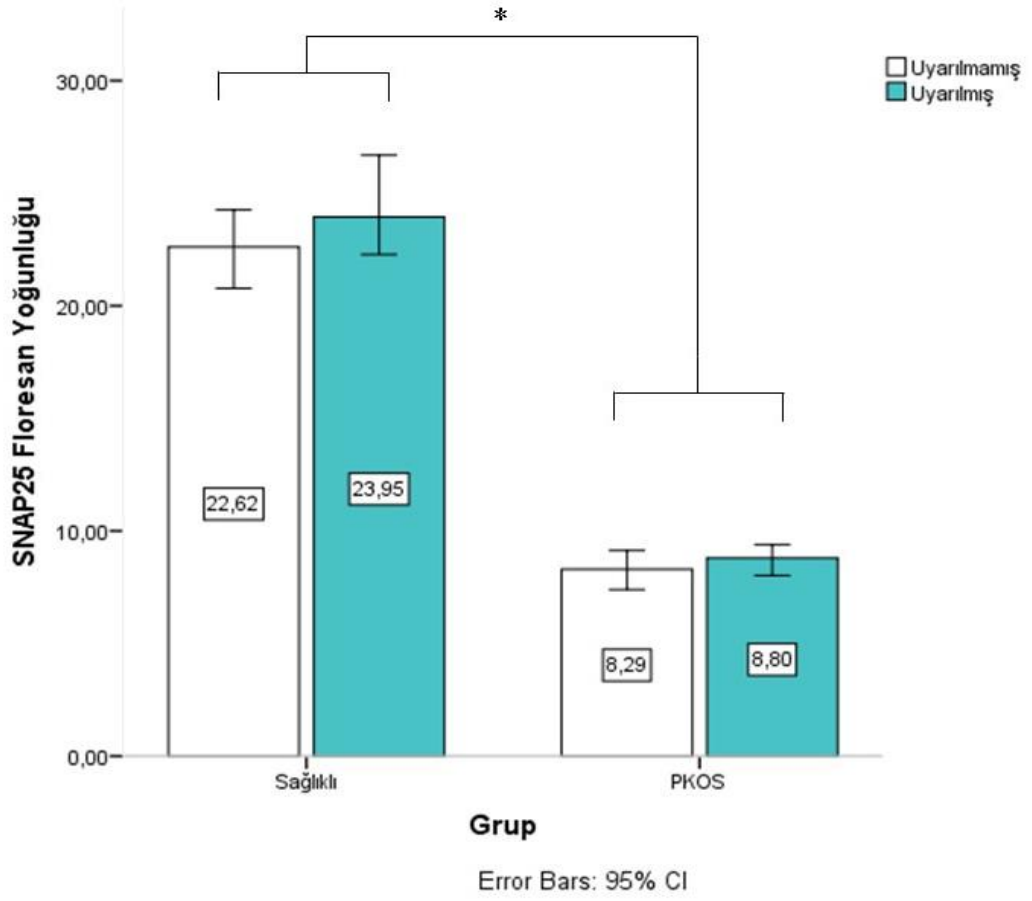
SNAP25 proteinin immünlüresan işaretlenmesinde hem kontrol (sağlıklı) hem de PKOS grubunda uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda işaretlenme izlendi. Kontrol grubunda SNAP25 işaretlenmesi PKOS grubuna göre hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda daha yoğundu. SNAP25 ifadesi farklı büyüklüklerde ve granüler izlendi. Kontrol grubunda sitoplazma içerisinde kümelenmiş büyük hacimli işaretlenmeler daha fazla görüldü. Uyarılmış grupta SNAP25 işaretlenmesi hücre periferine doğru dağılmış olarak izlendi (Şekil 16).

SNAP25'in granüloza hücrelerindeki immünfloresan yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildi. SNAP25 düzeyleri sağlıklı kadınlardan alınan granüloza hücrelerinde PKOS'a göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti (Mann-Whitney Testi, $p < 0,001$). Hem sağlıklı hem de PKOS grubunda hücrelerin FSH-hCG ile uyarılması sonucunda SNAP25 düzeyleri değişmedi (Tablo 13, Tablo 14).



Şekil 16: Granüloza hücrelerinde SNAP25 immünfloresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi.

Tablo 13: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde SNAP25 floresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.



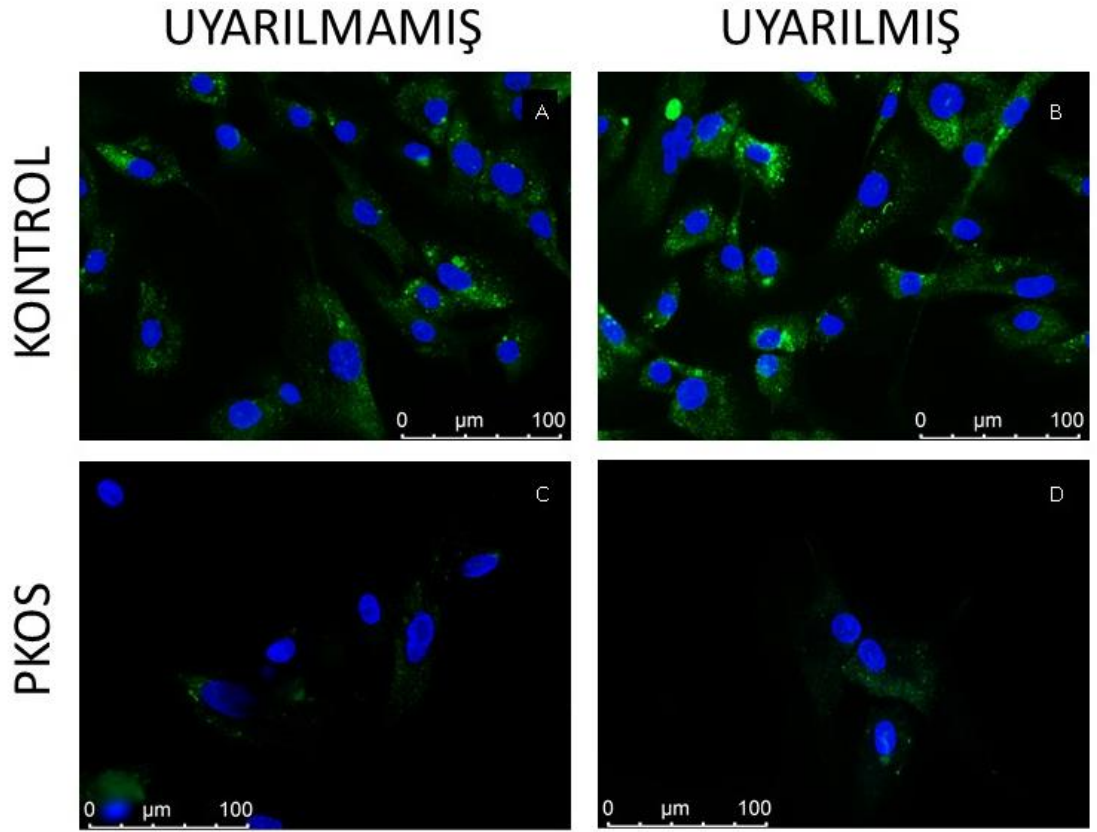
Tablo 14: Granüloza hücrelerinde ölçülen SNAP25 immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Grup	Ortanca	Çeyrekler arası genişlik	p değeri
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	22,6165	12,01	<0,001*
PKOS uyarılmamış	8,2945	4,98	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	22,6165	12,01	0,118
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	23,9490	13,70	
PKOS uyarılmamış	8,2945	4,98	0,093
PKOS uyarılmış	8,8000	4,57	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	23,9490	13,70	<0,001*
PKOS uyarılmış	8,8000	4,57	

4.3.4 StxBP1 İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi

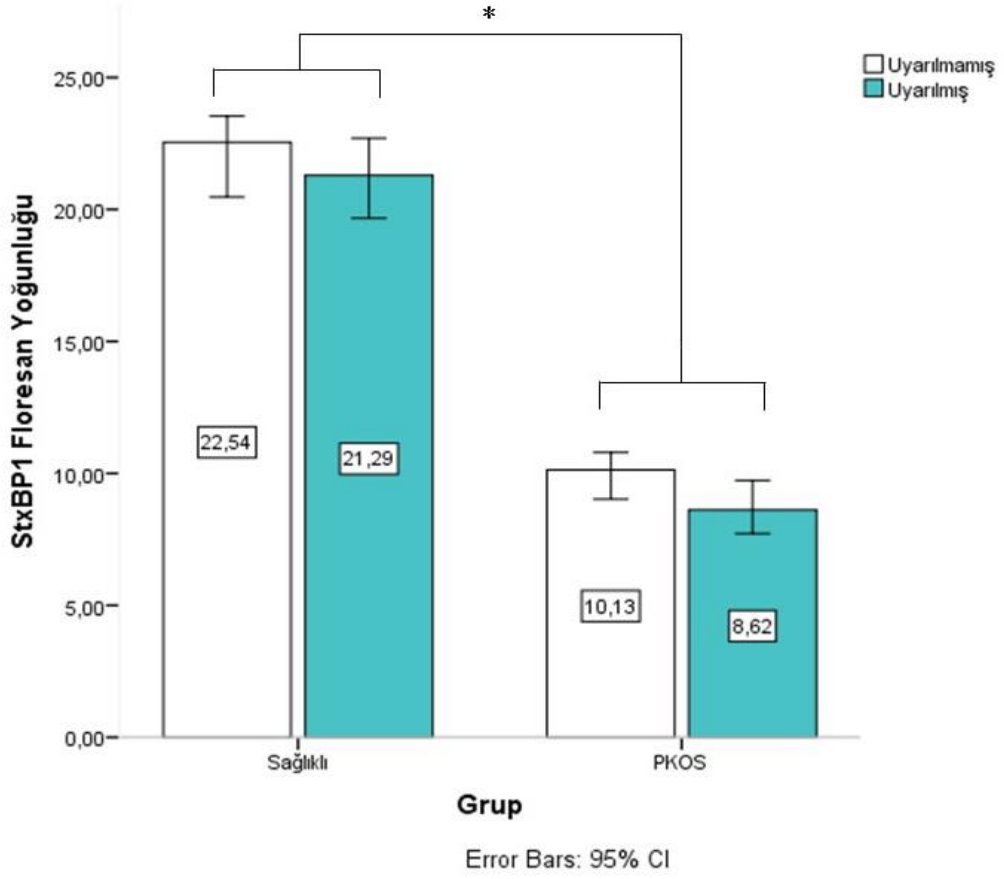
StxBP1 proteinin immünfloresan işaretlemesinde hem kontrol (sağlıklı) hem de PKOS'ta uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda işaretlenme izlendi. PKOS'ta uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda da StxBP1 işaretlenmesi yoğunluğu kontrolden daha azdı. Kontrol grubunda FSH-hCG uyarımıyla diffüz granüler boyanmanın hücre periferine doğru kümelenme gösterdiği dikkati çekti. Bu patern PKOS grubunda daha zayıf olarak izlendi (Şekil 17).

StxBP1 immünfloresan işaretlemesinin yoğunlukları incelendiğinde sağlıklı kadınlardan alınan granüloza hücrelerinde StxBP1 immünfloresan yoğunluğu PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (Mann-Whitney Testi, $p < 0,001$). Hem sağlıklı hem de PKOS'ta uyarılmaya bağlı olarak StxBP1 floresan yoğunluğunun değişmediği görüldü (Tablo 15, Tablo 16).



Şekil 17: Granüloza hücrelerinde StxBP1 immünfloresan işaretlemesi. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi.

Tablo 15: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde StxBP1 immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.



Tablo 16: Granüloza hücrelerinde ölçülen StxBP1 immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

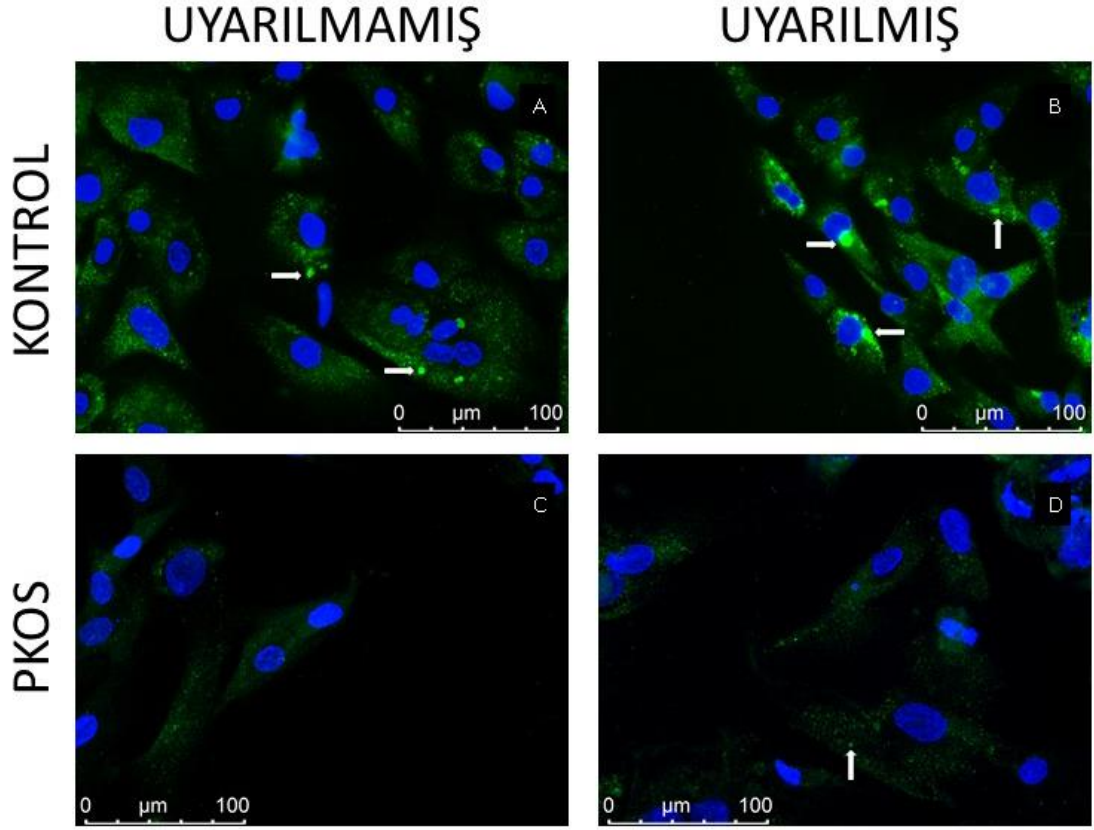
Grup	Ortanca	Çeyrekler arası genişlik	p değeri
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	22,5410	12,37	<0,001*
PKOS uyarılmamış	10,1320	9,50	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	22,5410	12,37	0,118
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	21,2945	13,53	
PKOS uyarılmamış	10,1320	9,50	0,029
PKOS uyarılmış	8,6170	7,47	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	21,2945	13,53	<0,001*
PKOS uyarılmış	8,6170	7,47	

4.3.5 KITL İmmünfloresan İşaretlemesinin Değerlendirilmesi

Uygulanan KITL immünfloresan işaretlemesinde hem kontrol (sağlıklı, erkek faktörü) hem PKOS grubunda uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda işaretlenme görüldü. Kontrol grubunda KITL işaretlenmesi PKOS grubuna göre daha yoğundu. Sitoplazma içinde dağınık granüler işaretlenme gözlemlendi. Özellikle kontrol grubunda yer yer kümelenmiş işaretlenme gösteren büyük yapılar görüldü. FSH-hCG uyarısı ile kontrol grubunda kümelenmiş immünfloresan işaretlenme gösteren yapıların arttığı izlendi (Şekil 18).

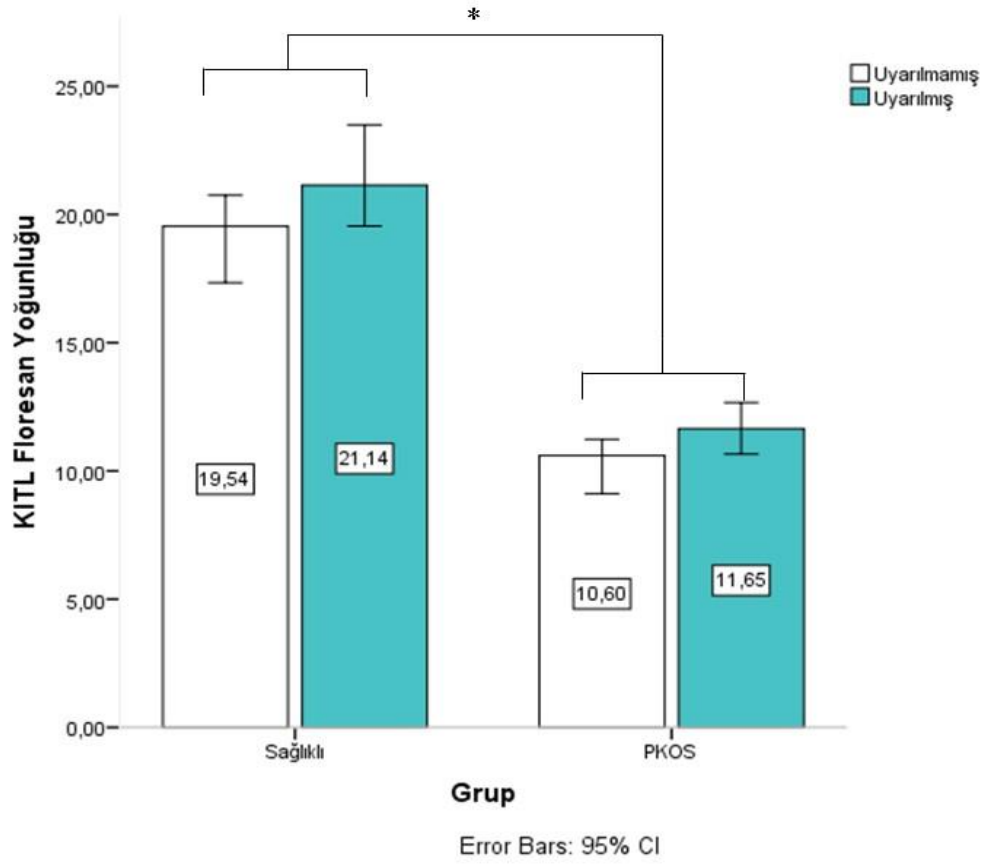
KITL'nin granüloza hücrelerindeki işaretlenmesinin floresan ışımaya yoğunlukları değerlendirildi. Sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde (kontrol grubu) KITL düzeyleri PKOS grubuna göre hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek tespit edildi (Mann-Whitney Testi, $p < 0,001$). Kontrol grubunda ölçülen KITL düzeyleri FSH-hCG uyarması ile artış gösterdi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Mann-Whitney Testi, $p = 0,051$). PKOS grubunda da KITL düzeyleri FSH-hCG uyarısı ile artış gösterdi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (Mann-Whitney Testi, $p = 0,134$). PKOS grubunda FSH-hCG uyarısına

yanıt olarak KITL düzeyindeki artış kontrol grubuna göre daha az oldu (Tablo 17, Tablo 18).



Şekil 18: Granüloza hücrelerinde KITL immünfloresan işaretlemesi. Oklar kümelenmiş KITL işaretlenmesini göstermektedir. **A:** Kontrol grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **B:** Kontrol grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS grubu uyarılmamış, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS grubu uyarılmış, x40 objektif büyütmesi.

Tablo 17: Sağlıklı ve PKOS granüloza hücrelerinde KITL immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

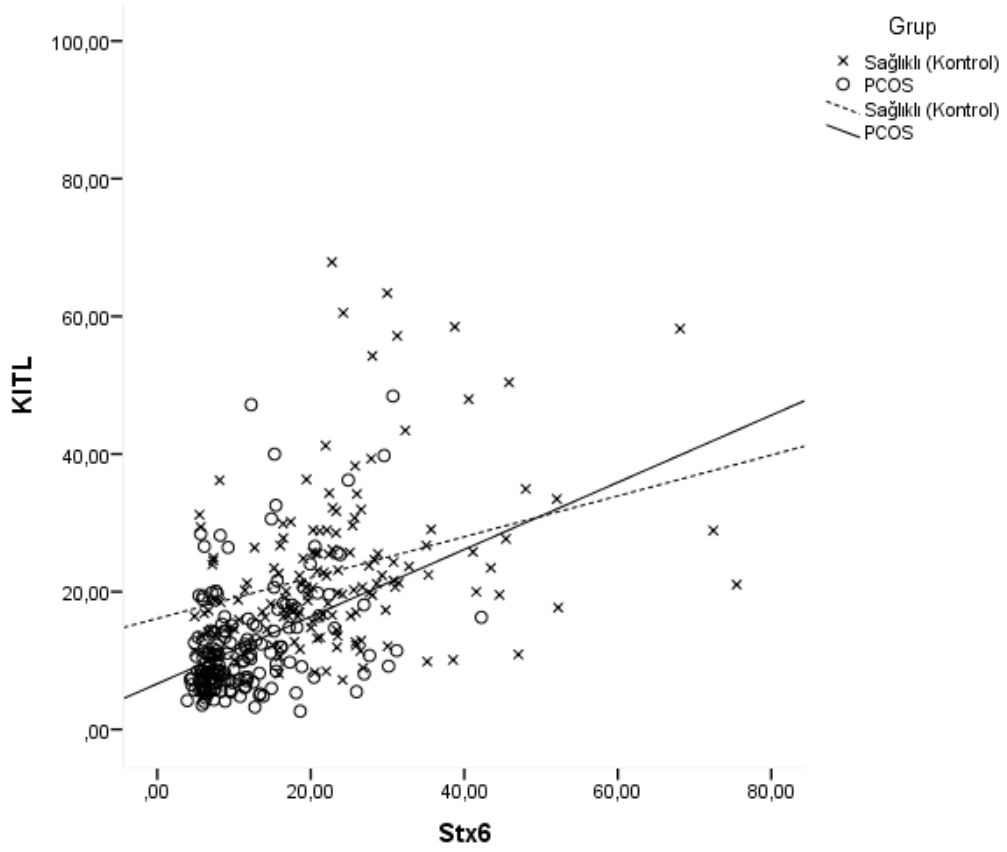


Tablo 18: Granüloza hücrelerinde ölçülen KITL immünfloresan yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Grup	Ortanca	Çeyrekler arası genişlik	p değeri
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	19,5425	12,21	<0,001*
PKOS uyarılmamış	10,5990	8,06	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmamış	19,5425	12,21	0,051
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	21,1430	14,87	
PKOS uyarılmamış	10,5990	8,06	0,134
PKOS uyarılmış	11,6510	7,01	
Sağlıklı (Kontrol) uyarılmış	21,1430	14,87	<0,001*
PKOS uyarılmış	11,6510	7,01	

KITL ile Stx6, SNAP25 ve StxBP1 düzeyleri arasındaki korelasyon incelendiğinde KITL ile Stx6 arasında pozitif yönlü orta kuvvette korelasyon görüldü. Sağlıklı granüloza hücrelerinde KITL ve Stx6 arasındaki korelasyon katsayısı 0,314, $p < 0,001$ olarak, PKOS hücrelerinde ise korelasyon katsayısı 0,355, $p < 0,001$ olarak tespit edildi (Tablo 19).

Tablo 19: KITL ve Stx6 arasındaki korelasyon grafiği. Kontrol grubu korelasyon katsayısı 0,314 ($p<0,001$), PKOS grubu için korelasyon katsayısı 0,355 ($p<0,001$) (Spearman Korelasyon Testi)



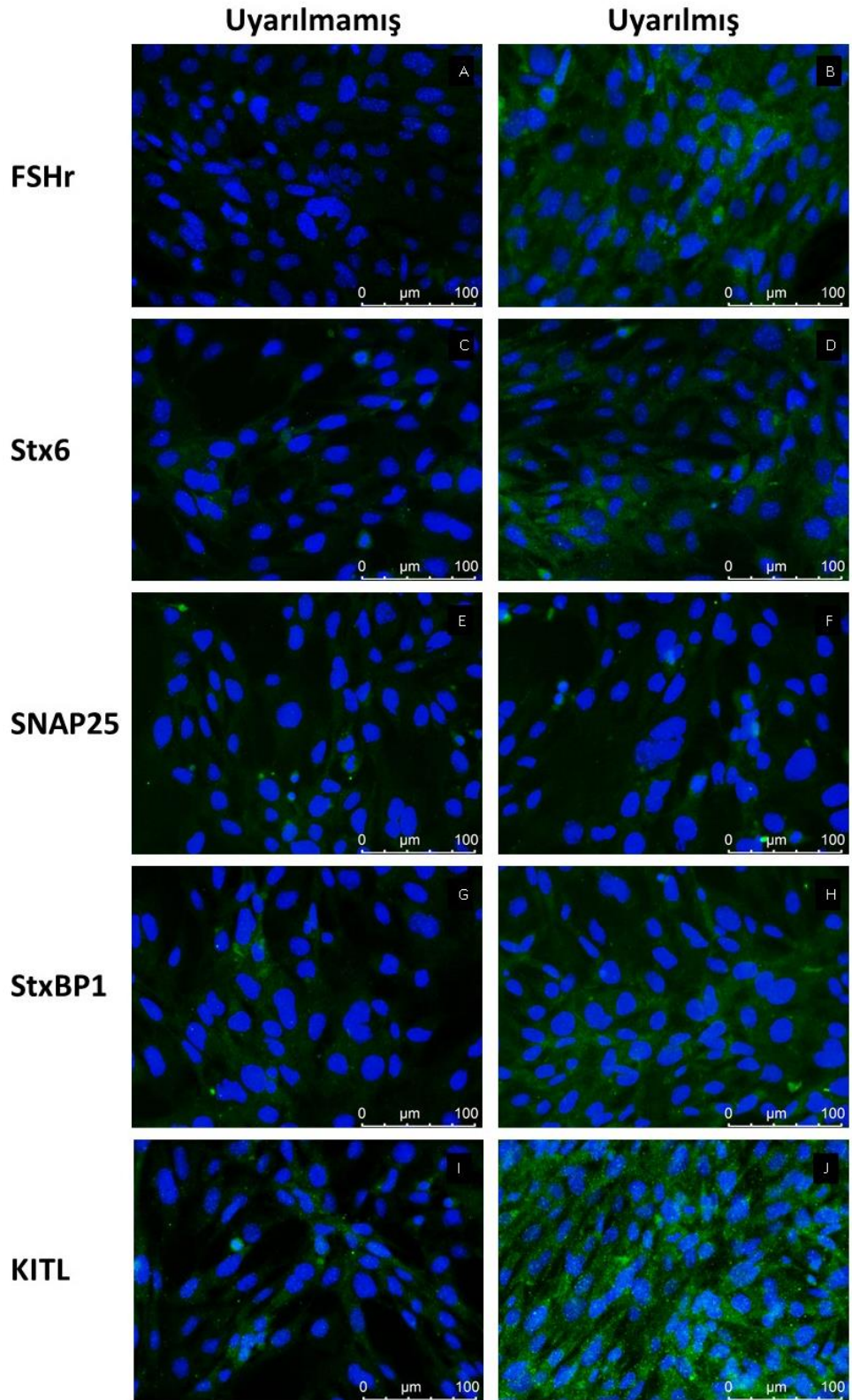
4.3.6. HGL5 H¼ce Hattında FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL

İmm¼nfloresan İfadesinin Değerlendirilmesi

HGL5 h¼ce hattında FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL imm¼nfloresan işaretlemesi uygulandı. HGL5 h¼ce hattında da primer insan gran¼loza k¼lt¼r h¼crelerine benzer olarak hem uyarılmamış hem de FSH-hCG ile uyarılmış koşullarda imm¼nfloresan işaretlenme izlendi (şekil 19).

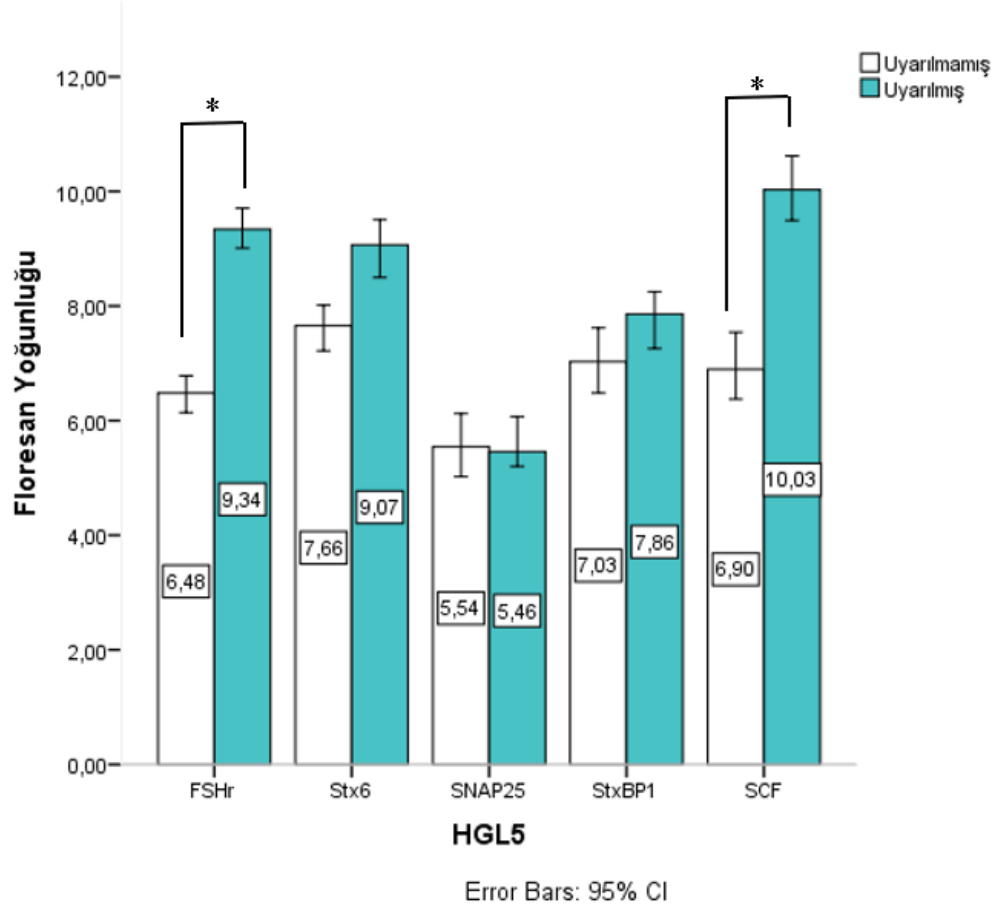
FSHr imm¼nfloresan yoğunluğu FSH-hCG uyarısı ile istatistiksel olarak anlamlı artmış olduğu g¼r¼ld¼ (Mann-Whitney Testi, $p<0,001$). FSH-hCG uyarısına bağlı olarak

Stx6 floresan yoğunluğundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. SNAP25 ve StxBP1 işaretlemelerinin yoğunlukları da FSH-hCG uyarısına bağlı olarak değişiklik göstermedi. HGL5 hücrelerindeki KITL'in floresan yoğunluğu FSH-hCG uyarısı ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü (Mann-Whitney Test, $p < 0,001$) (Tablo 20, Tablo 21).



Şekil 19: HGL5 hücrelerinde FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL'nin immünfloresan işaretlemeleri. X40 objektif büyütmesi.

Tablo 20: HGL5 hücre hattı hücrelerinde FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL immünfloresan yoğunluğu düzeyleri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.



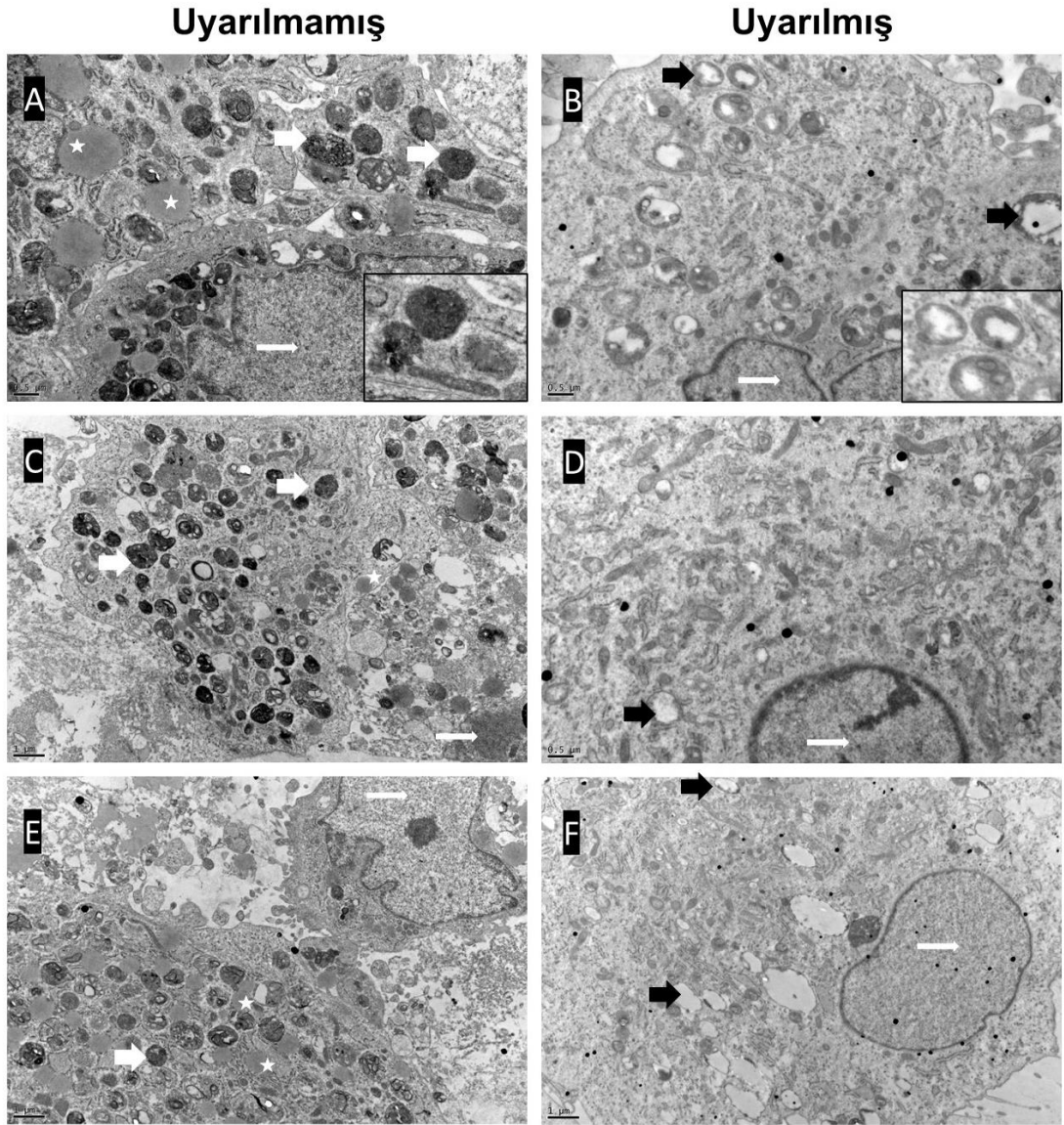
Tablo 21: HGL5 hücre hattında FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL yoğunluklarının istatistiksel verileri. * istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

HGL5		Ortanca	Çeyrekler arası genişlik	p değeri
FSHr	Uyarılmamış	6,4800	1,41	<0,001*
	Uyarılmış	9,3395	2,67	
Stx6	Uyarılmamış	7,6550	2,94	0,105
	Uyarılmış	9,0675	3,08	
SNAP25	Uyarılmamış	5,5405	1,22	0,979
	Uyarılmış	5,4550	1,60	
StxBP1	Uyarılmamış	7,0315	2,17	0,081
	Uyarılmış	7,8575	1,74	
KITL	Uyarılmamış	6,8975	2,03	<0,001*
	Uyarılmış	10,0275	1,95	

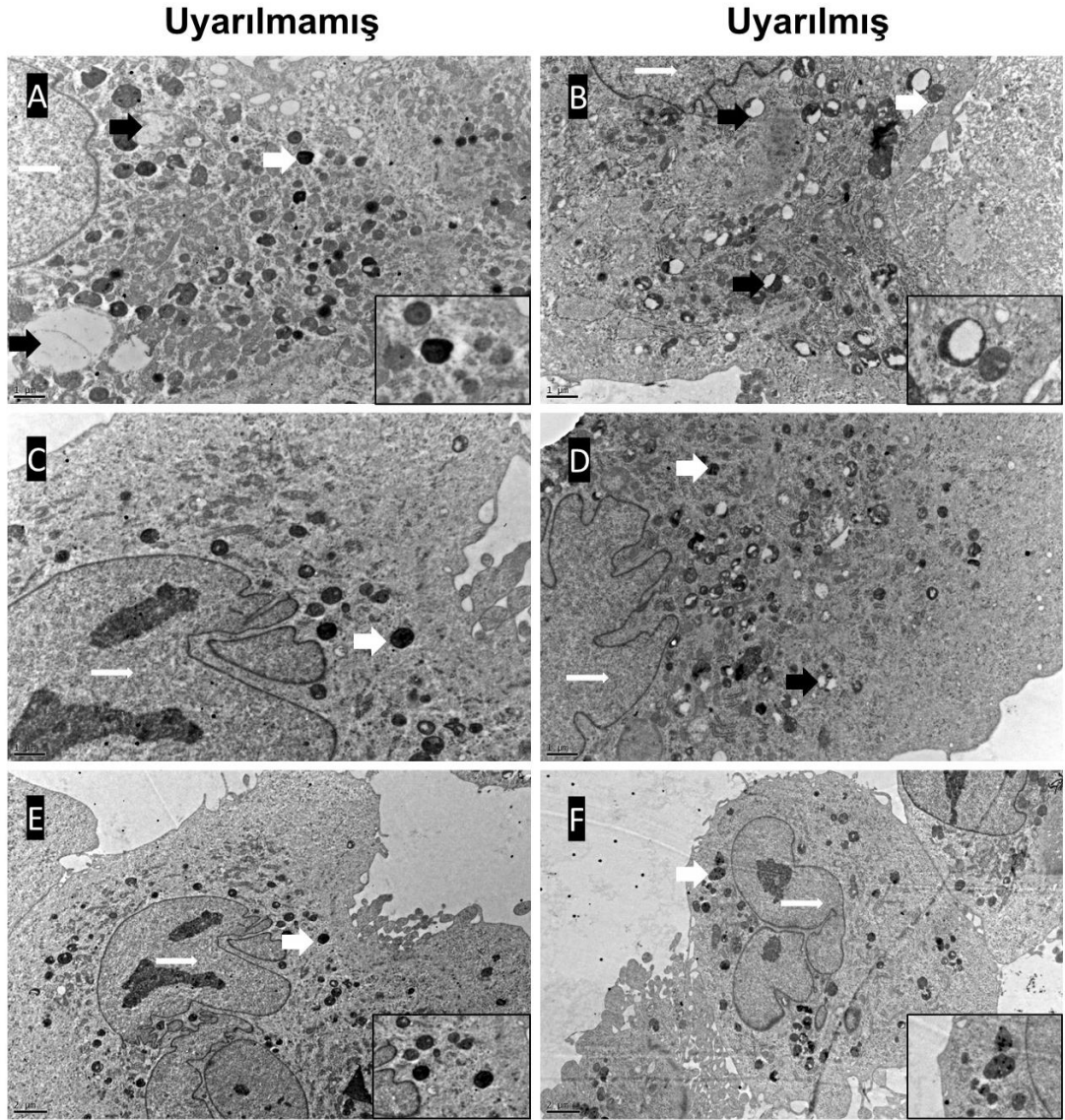
4.4. Kontrol (Sağlıklı, Erkek Faktörü) ve PKOS Grubu Granüloza Hücrelerinin Elektron Mikroskobunda İncelenmesi

Sağlıklı (kontrol) kadınların ve PKOS'lu kadınların granüloza hücreleri hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda elektron mikroskobunda incelendi. Kontrol ve PKOS granüloza hücreleri çekirdek yapıları, sitoplazma membranı yapıları ve kromatin dağılımı göz önüne alındığında benzer morfolik özellik gösteren hücreler olduğu görüldü. Kontrol grubu hücrelerinde uyarılmamış koşullarda hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda membransız özellikleriyle lipid damlacıkları izlendi. Uyarılmış koşullarda ise lipid damlacıklarının fazla sayıda olmadığı dikkati çekti. PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerinde hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda lipid damlacıklarına sağlıklı gruptaki granüloza hücreleri kadar sık rastlanmadı. PKOS grubunda sitoplazma içindeki membranöz organellerin daha az belirgin olduğu izlendi. Kontrol grubu hücrelerinin uyarılmamış koşullarda veziküllerden zengin olduğu görüldü. FSH-hCG uyarısı ile vezikül miktarının oldukça azaldığı izlendi. Uyarılmış koşullarda kontrol grubu granüloza hücrelerinde boş veya kısmen boş veziküller izlendi, ayrıca veziküllerin elektron dansitesi uyarılmamış koşula

göre azalmıştı. PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerinde uyarılmamış koşullarda kontrol grubuna göre vezikül miktarı oldukça azdı. PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerinde uyarılmış koşullarda elektron dansitesi yüksek veziküllerin kalıcı olduğu görüldü (şekil 20, şekil 21).



Şekil 20: Sağlıklı (kontrol) kadınlardan alınan granüloza hücrelerinin in vitro kültürü sonrasında elektron mikrografları. Kalın beyaz oklar elektron dansitesi yüksek vezikülleri, beyaz yıldızlar lipid damlacıklarını, ince beyaz oklar çekirdeği, siyah oklar boş veya kısmen boş vezikülleri göstermektedir. (A, B ve D mikrografları X20.000; C, E ve F mikrografları X8.000)



Şekil 21: PKOS'lu kadınlardan alınan granüloza hücrelerinin in vitro kültürü sonrasındaki elektron mikrografları. Uyarılmış koşullarda varlığı devam eden elektron dansitesi yüksek veziküller görülmekte. Uyarılmamış koşullarda sitoplazmanın vezikül içeriği kontrol grubuna göre azalmış izlenmektedir. Kalın beyaz oklar elektron dansitesi yüksek vezikülleri, ince beyaz oklar çekirdeği, siyah oklar boş veya kısmen boş vezikülleri göstermektedir. (A, B, C ve D mikrografları 12.000 büyütme; E ve F mikrografları 6.000 büyütmede çekilmiştir.)

5. TARTIŞMA

Hücre içi vezikül ve membran trafiği hücrenin fonksiyonları ve sağkalımı için temeldir. Membranların yeniden kazanımı, veziküllerin yönlendirilmesi ve matürasyonu, endositoz ve ekzositoz fonksiyonları vezikül füzyon proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. SNAP25, Stx6 ve StxBP1 bu trafiğin önemli moleküllerindendir. Granüloza hücreleri sentez ve salgılama fonksiyonlarını vezikül ve membran trafiği ile gerçekleştirir. Granüloza hücreleri ovaryum folikülü mikro çevresinin ana belirleyicisidir. Folikülogenezin gerçekleşmesi için gerekli sinyal molekülleri folikül mikro çevresinde bulunur. Mikro çevrenin bozulması ise folikülopatilere neden olur. PKOS'ta gözlenen folikülopati ise folikülogenezin antral folikül evresinde durması ve kistik folikül oluşumudur.

Araştırmamızda erkek faktörü nedenli başvuran çiftlerin sağlıklı kadınları ile PKOS tanısı almış kadınların arasında yaş dağılımı istatistiksel anlamlı fark göstermemiştir. Ancak PKOS'lu kadınların daha ileri yaş ortancasına sahip olmaları puberte sonrası dönemde PKOS tanısının konulmasıyla önerilen yaşam tarzı değişikliği, klomifen sitrat veya metformin gibi ilaçların kullanımının zaman alması ve öncelikle gonadotropinle beraber intrauterin inseminasyon uygulaması⁹⁶ gibi nedenlerle açıklanabilir. İn-vitro fertilizasyon bu aşamalardan sonra infertilite tedavisi için gündeme geldiğinden PKOS grubundan elde edilen granüloza hücreleri daha ileri yaştaki kadınlara aittir. Ancak bu yaş farkı istatistiksel olarak anlamlılık göstermediğinden vezikül trafiği konusundaki sonuçlarımızı etkilemeyecektir.

Kültürünü yaptığımız granüloza hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki morfolojilerinin grup içindeki katılımcılar ve gruplar arasında benzerlik göstermesi primer hücre kültürünün başarıyla gerçekleştiğini ve diğer hücrelerle kontaminasyon içermediğini gösterir. Faz kontrast mikroskobundaki morfolojik bulgular epitelooid hücrelerden olan granüloza hücresi morfolojik bulgularına benzer görülmüştür^{97,98}. Ayrıca HGL5 hücre hattında yapılan FSHr, SNAP25, Stx6, StxBP1 ve KITL immün işaretlemelerinde primer kültür hücreleri ile benzer bulgular göstermesi bu sonucumuzu desteklemektedir.

Sağlıklı ve PKOS tanısı almış kadınların granüloza hücreleri, in-vitro ortamda FSH-hCG ile uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda FSH reseptörü ifade eder. Sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde FSH-hCG uyarısı ile FSHr işaretlenme paterni sıklıkla hücre sitoplazması içinde çekirdeğe yakın yerleşime değiştiği gözlenmiştir. Reseptör internalizasyonu bulgusu olarak gözlenen bu yerleşim değişikliği sağlıklı granüloza hücrelerinin FSH-hCG ile uyarıya yanıt verdiğini ve reseptörün uyarıldığını göstermektedir⁸⁹. Sağlıklı granüloza hücrelerinde uyarılmış koşullarda uyarılmamış koşullara göre daha yoğun FSHr immün işaretlenmenin olması hCG'nin upregülasyon etkisi olarak yorumlanabilir⁸⁷. Ayrıca PKOS'ta reseptör internalizasyonu bulgusu kontrol grubu kadar güçlü değildir. PKOS'ta hücreler uyarıldığında da sağlıklı granüloza hücrelerine benzer şekilde FSH reseptörü artmıştır. Klinik uygulamalarda PKOS'lu kadınların ovulasyon indüksiyonu sırasında ekzojen gonadotropinlere sağlıklı kadınlardan daha fazla duyarlı olduğu belirtilmektedir⁹⁹. Ancak bizim in-vitro bulgularımızda PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerinde FSHr düzeyi sağlıklara göre oldukça düşük gözlenmiştir. Klinik uygulamada ekzojen gonadotropinler in-vivo kullanılmakta ve etkileri klinik olarak gözlenmektedir. PKOS'lu kadınların klinik bulgularında hiperandrojenizm de mevcuttur⁵⁹. Juan ve arkadaşları sağlıklı kadınlardan elde ettikleri granüloza hücrelerinde yaptıkları in-vitro çalışmada hücrelerin besiyerine testosteron eklenmesiyle FSHr ekspresyonunda artma gözlemlemişlerdir⁸⁷. PKOS'lu kadınlarda fazla salgılanan testosteron ve diğer androjenler FSHr'nin in-vivo olarak fazla duyarlılığından sorumlu olabilir. Ayrıca in vivo koşullarda folikül mikro çevresinin in-vitro koşullara göre daha karmaşık olması, ortamda bulunan diğer büyüme faktörlerinin de etkisiyle FSHr duyarlılığına katkıda bulunabilir. Ancak çalışma bulgularımıza göre PKOS'ta olan FSHr düzeyindeki azalmayı hCG'nin yaptığı FSHr upregülasyonu düzeltememiştir.

Stx6, immatür sekretuar veziküllerin homotipik füzyonunu gerçekleştirerek maturasyonunu sağlar^{19,75}, plazma membranının erken endozomdan plazma membranına yeniden kazanımında rol alır. Ayrıca paketlenmiş veziküllerin uyarılmış salgı yolağına katılmasına^{75,78} ve plazma membranının düzenlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir⁷⁴. Bu nedenle reseptör internalizasyonu ve yeniden

kazanımı, hücre içi kolesterol taşınımı ve uyarılmış veziküler taşınımı gerçekleştirmek gibi önemli işlevleri yerine getirir¹⁹. Araştırmamızda sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinde uyarılmamış koşullarda Stx6'nın işaretlenme paterni sitoplazma içinde sıklıkla çekirdek komşuluğundadır ve uyarılmış koşullarda hücre periferine doğru yer değiştirmiştir. PKOS'ta ise hem FSH-hCG ile uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda Stx6, sağlıklı granüloza hücrelerine göre daha az görülmüş ve hücre içindeki yerleşiminde uyarılmayla herhangi bir farklılık da göstermemiştir. Tüm katılımcıların Stx6 işaretlemelerinin floresan yoğunlukları karşılaştırıldığında PKOS'ta hem uyarılmış hem de uyarılmamış koşullarda sağlıklı granüloza hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğunun saptanması da PKOS grubunun FSH-hCG uyarısına verdiği cevapsızlığın bir başka göstergesi olduğunu düşündürmüştür.

Reseptör internalizasyonunda ve yeniden kazanımında rolü olan Stx6, SNARE moleküllerindedir¹⁹. FSHr ile Stx6'nın floresan yoğunlukları arasında pozitif yönlü zayıf korelasyonun bulunması FSH reseptörünün; Golgi aygıtından plazma membranına taşınmasında, uyarıldığında internalizasyonu ve yeniden membrana kazanımı sürecinde Stx6'nın da görevi olduğunu desteklenmektedir. Sağlıklı granüloza hücrelerinde FSHr internalizasyonunu gösteren bulguların belirgin olduğu düşünülürse, PKOS granüloza hücrelerinin sağlıklı kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerine göre Stx6'nın düşük düzeylerde gözlenmesi PKOS grubunda bozulan FSHr internalizasyonu ve yeniden membrana kazanımı ile ilişkili olabilir.

Hem hücre içindeki kalsiyum ile düzenlenen ekzositoz sürecinde gerçekleşen vezikül füzyon kompleksinin oluşumunda⁶⁹ hem de hücre içi kalsiyum miktarının belirlenmesinde rol oynaması⁶⁶⁻⁶⁸ ile SNAP25, düzenlenmiş salgı yolunun temel SNARE moleküldür. Her iki grupta da hücreler morfolojik olarak değerlendirildiğinde farklı büyüklükte granüler SNAP25 işaretlenmesi izlenmiştir. Sağlıklı kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerinde SNAP25'in FSH-hCG uyarısı ile kümelenmiş, büyük boyutlarda ve yoğun olarak saptanması vezikül matürasyonu sürecini göstermektedir. PKOS'ta SNAP25 kümelenmesinin sağlıklı granüloza hücrelerindeki kadar büyük boyutlarda ve yoğunlukta saptanmaması salgı veziküllerinin birleşerek matürasyon göstermesi sürecinin PKOS'ta aksadığını düşündürmektedir. PKOS'ta SNAP25'in hem

uyarılmamış hem de FSH-hCG ile uyarılmış koşullarda kontrol grubuna göre azalmış olması, elektron mikroskopik incelemede PKOS granüloza hücrelerindeki FSH-hCG ile uyarılmış veziküller yanıtın oluşmamasıyla birlikte birbirini destekleyen bulgulardır. Elektron mikroskopik incelemede saptanan PKOS'ta veziküller yanıtın bozulması SNAP25 ile ilişkili olabilir.

StxBP1, salgı veziküllerinin ekzositozunda vezikül füzyonu için yardımcı proteindir¹⁰⁰. Nöronal ve nöronal olmayan hücrelerde vezikül taşınması, plazma membranı ile vezikül kaynaşması ve veziküllerin oluşmasında görev alır¹⁰¹. Shim ve arkadaşları genom ölçekli ilişki çalışması (GWAS= Genome-Wide Association Study) veri tabanını kullanarak yaptıkları incelemeler sonucunda StxBP1'in PKOS ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu bildirmişlerdir ve bulgularını StxBP1'in insülin salgılanmasındaki görevine bağlamışlardır¹⁰². Kim ve arkadaşları pubertedeki sıçanlarda östrojenin hipotalamusta StxBP1 ifadelerini artırdığını, böylece glutamat salgısının arttığını tespit etmişlerdir¹⁰³. Olesen ve arkadaşları ise embriyonik fare ovaryumlarında yaptıkları araştırmada mayozun başladığı zaman diliminde StxBP1 ekspresyon düzeyinin arttığını tespit etmiştir¹⁰¹. StxBP1 proteini genital sistemin hem hormonal kısmında hem de ovaryum kısmında görev almaktadır. Bulgularımıza göre insan granüloza hücreleri de sitoplazmada granüler görünümlü StxBP1 içermektedir. StxBP1 sağlıklı granüloza hücrelerinde FSH-hCG uyarısı ile sitoplazma içinde plazma membranı yakınlarında yoğun ve artan miktarda kümelenme eğilimi göstermiştir. PKOS granüloza hücrelerinde StxBP1'in FSH-hCG ile uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda düşük düzeyde olması Shim ve arkadaşlarının veritabanı temelli çalışmalarında elde ettikleri StxBP1 ve PKOS ilişkisine benzerdir. Çalışmamızda Shim ve arkadaşlarının bulguları bir diğer endokrin salgı yapan granüloza hücreleri ile de desteklenmiştir. Ancak Shim ve arkadaşlarının çıkarımının yanı sıra StxBP1'in PKOS'taki ilişkisinin granüloza hücresi nedenli olduğu bulgularımız ile ortaya konulmuştur. PKOS'ta StxBP1'in granüloza hücrelerindeki değişimi ilk kez çalışmamız ile saptanmıştır.

KITL ovaryum dokusunda embriyonik hayattan itibaren ifadelenen büyüme faktörlerindedir. Primordial germ hücrelerinin göçü, proliferasyonu, sağkalımı;

primordial foliküllerin aktivasyonu; granüloza hücrelerinin proliferasyonu; mayozdaki duraklamanın devamlılığı ve ovaryumda steroidogenezin düzenlenmesinde görev alır⁵⁷. Granüloza hücresi kökenli KITL, folikül içindeki hücrelerin proliferasyonu ve sağkalımında temel büyüme faktörüdür^{49,52,104}. İnsan granüloza hücrelerinde yapılan KITL floresan işaretlemesi morfolojik olarak incelendiğinde sağlıklı granüloza hücrelerinde sitoplazma içinde büyük kümeler halinde izlenmiştir. Bu işaretlenme paterni lokalizasyon açısından vezikül füzyon proteinleri ile benzerlik göstermektedir. Ancak PKOS'ta işaretlenme paterni değerlendirildiğinde kontrol grubundaki gibi kümelenmiş granüler işaretlenme görülmemiştir. PKOS grubunda FSH-hCG ile uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda KITL'in kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olması Tan ve arkadaşlarının PKOS'lu kadınların folikül sıvısı ve serumunda yaptıkları araştırmadaki "KITL düzeylerinin PKOS'ta azalır" tespitini desteklemektedir⁶¹. FSH-hCG uyarısı dahi PKOS granüloza hücrelerinde KITL ifadesini düzeltmemiştir.

Her iki grup içinde Stx6 ve KITL immün işaretlemeleri arasında pozitif yönlü orta kuvvetli anlamlı korelasyon görülmüş olması KITL'in veziküler taşınımında Stx6'nın görevinin de olduğunu desteklemektedir. Granüloza hücrelerinde Stx6'nın fonksiyonları ile ilgili araştırma bulunmamaktadır. Araştırmamız bu konuda ilk çalışmadır.

İnsan granüloza hücrelerinden üretilmiş sertifikalı HGL5 hücre hattında da FSH-hCG ile uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL immünfloresan işaretleme ve yoğunluk değerlendirmesi yapılmıştır. HGL5 hücre hattında FSH-hCG uyarısı ile FSH reseptörü primer kültür hücrelerindeki bulgulara benzer şekilde istatistiksel olarak artmıştır. Ancak primer granüloza kültürü hücrelerinden farklı olarak KITL işaretleme yoğunlukları da HGL5 hücre hattında FSH-hCG uyarısı ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. HGL5 hücrelerinin FSH-hCG uyarısına verdikleri KITL yanıtının primer granüloza hücrelerinden daha fazla olmasının nedeni primer granüloza hücrelerinin antral folikülden izole edilmiş ve daha senil hücreler olmasına rağmen hücre hattının ölümsüzleştirilmiş hücreler olması

olabilir. Stx6, SNAP25 ve StxBP1'in FSH-hCG uyarısına verdiği yanıt HGL5 hücre hattında da primer kültür hücrelerine benzer olarak saptanmıştır.

Sekretuar veziküllerin trafiği değerlendirildiğinde ekzositoza uğrayacak vezikül paketinin plazma membranı ile tamamen kaynaştığı düşünülür. Ancak elektron mikroskopi incelemelerinde ekzositozun plazma membranı ile tamamen birleşerek gerçekleştiği durumlar nadiren gözlenir¹⁰⁵. Çoğunlukla salgılanacak edilecek içerik vezikül içinden kısmen veya tamamen salgılanır, bunun sonucu olarak sitoplazma içinde elektron dansitesi farklı düzeylerde tamamen veya kısmen boş veziküller izlenir ve bunlar kısmi degranülasyon nedeniyle oluşur. Bu bulgulara göre geçici füzyon geçidi oluşumu ekzositozun temel mekanizması olarak karşımıza çıkar^{105,106}. Çalışmamızda sağlıklı katılımcılardan elde edilen granüloza hücreleri uyarılmamış koşullarda incelendiğinde sitoplazma içinde elektron dansitesi yüksek, farklı büyüklükte ve heterojen içeriğe sahip veziküllerin bulunduğu, FSH-hCG ile 24 saat boyunca uyarımın sonrasında elektron dansitesi yüksek veziküllerin azaldığı saptanmıştır. Veziküllerin çoğu boş veya kısmen boş olarak görülmüştür. Ayrıca vezikül sayısı da FSH-hCG uyarısı ile azalmış olarak izlenmiştir. Toonen ve arkadaşları adrenal kromaffin hücrelerinde StxBP1 füzyon proteinini susturarak ve ifadelerini artırarak sekretuar vezikülleri elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. StxBP1'in susturulduğu hücrelerde elektron yoğun veziküllerin sitoplazma içinde kaldığını gözlemlemişlerdir. StxBP1 ifadesine müdahale edilmemiş ve artırılmış hücrelerde ise veziküllerin plazma membranına doğru yer değiştirdiğini ve membran ile füzyon geçidi oluşturduklarını bildirmişlerdir¹⁰⁷. Çalışmamızda granüloza hücrelerinde plazma membranı ile kaynaşma aşamasında olan veziküller elektron mikroskobunda izlenmemiştir, ancak FSH-hCG ile uyarılmış kontrol grubu granüloza hücrelerinde boş veya kısmen boş veziküller görülmüştür. Ayrıca vezikül sayısı da uyarılmamış kontrol grubu granüloza hücrelerine göre azalmıştır. Bu durum 24 saat süren FSH-hCG uyarısının süresi ile ilişkili olabilir. Yani FSH-hCG uyarısının süresi kısa tutulduğunda plazma membranı ile kaynaşarak füzyon geçidi oluşturan veziküller elektron mikroskopik incelemede tespit edilecektir.

Polikistik over sendromu tanısı almış katılımcılardan elde edilen granüloza hücrelerinde yapılan elektron mikroskopik incelemede uyarılmamış koşullarda sitoplazma içinde elektron dansitesi yüksek veziküllerin sağlıklı granüloza hücrelerinin sitoplazmasına göre daha az yer tuttuğu saptanmıştır. FSH-hCG uyarısı ile elektron dansitesi yüksek veziküllerin PKOS'ta kalıcı olması ve az bir kısmının boş veya kısmen boş veziküllerden oluşması PKOS hastalarından elde edilen granüloza hücrelerinde FSH-hCG uyarısına veziküler cevabın oluşmadığını düşündürmektedir. PKOS hastalarında yapılan Stx6, SNAP25 ve StxBP1 vezikül füzyon proteinlerinin sağlıklı kadınların granüloza hücrelerine göre azalmış olması, elektron mikroskopi bulgularıyla birlikte düşünüldüğünde PKOS hastalarının granüloza hücrelerinde vezikül füzyonu ve ekzositozunun bozulduğu sonucuna ulaşılabilir.

Çalışma bulgularımızın sonucunda PKOS'ta folikül içi mikro çevredeki KITL gibi folikül içi faktörlerin düzeyindeki azalma; granüloza hücrelerinin sentez kapasitesindeki azalmanın yanında, ekzositoz yeteneğindeki bozulmaya da bağlı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda incelenen vezikül füzyon proteinlerindeki azalma FSH-hCG etkisiyle düzelmediği gibi, elektron mikroskopik incelemede de FSH-hCG etkisiyle elektron dansitesi yüksek veziküllerin ekzositozunun gerçekleşmediği ortaya konmuştur. Ayrıca PKOS'lu kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerinde FSHr internalizasyonu da bozulmuş olarak saptanmıştır. PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerindeki vezikül füzyon proteinleri ile ilişkili fonksiyonlardan; FSHr internalizasyonu ve ekzositozun bozulduğu, bu bozulmanın FSH-hCG uyarısı ile düzelmediği in-vitro koşullarda ilk defa çalışmamız ile ortaya konmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. PKOS tanılı ve erkek kaynaklı nedenlerle üreme tedavisi için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tüp Bebek Merkezine yönlendirilen kadınlar arasında istatistiksel anlamlı yaş farkı bulunmamıştır.
2. İnsan granüloza hücreleri Stx6, SNAP25 ve StxBP1 ifade etmektedir.
3. İn-vitro koşullarda insan granüloza hücrelerinde FSH-hCG uyarısı ile FSHr istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artar.
4. PKOS'lu kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerinde in-vitro koşullarda FSHr, Stx6, SNAP25, StxBP1 ve KITL ifadeleri sağlıklı kadınların granüloza hücrelerine göre istatistiksel anlamlı düzeyde azdır.
5. FSHr ve Stx6 işaretlenmeleri arasında pozitif yönlü zayıf korelasyon vardır. Bu bulguya göre Stx6'nın FSHr internalizasyonunda da rolü olabileceği ortaya konmuştur.
6. PKOS'lu kadınlardan elde edilen granüloza hücrelerinde in-vitro koşullarda FSH-hCG uyarısı ile morfolojik olarak FSHr internalizasyonunun bozulduğu saptanmıştır. Stx6 düzeylerindeki azalmanın FSHr internalizasyonundaki bozulma ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur.
7. Elektron mikroskopik incelemede sağlıklı granüloza hücrelerinde FSH-hCG uyarısı ile sitoplazma içinde boş veya kısmen boş veziküllerin arttığı saptanmıştır.
8. Elektron mikroskopik incelemede PKOS'lu hastalardan elde edilen granüloza hücrelerinin in-vitro koşullarda FSH-hCG uyarısına verdikleri uyarılmış salgı vezikülü yanıtının bozulduğu saptanmıştır.

Çalışmamız ile PKOS'lu kadınlardan elde edilen insan granüloza hücrelerinde vezikül füzyon proteinlerinden Stx6, SNAP25 ve StxBP1'in azaldığı, bu proteinlerin fonksiyonlarından FSHr internalizasyonu ve uyarılmış salgı yolağının bozulduğu ortaya konmuştur. Ancak folikül içindeki zengin ve karmaşık mikro çevre nedeniyle in-vivo ortamdaki yanıtta farklılıklar olabilir. Bu nedenle insan granüloza hücrelerinin vezikül biyolojisi in-vivo koşullar için de PKOS patogenezi açısından araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Azziz, R. *et al.* Polycystic ovary syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16057 (2016).
2. Torpy, J. M., Lynn, C. & Glass, R. M. Polycystic ovary syndrome. *J. Am. Med. Assoc.* **297**, 554 (2007).
3. Andreeva, P., Milachich, T. & Shterev, A. ART treatment of infertile patient with PCO. in *Polycystic Ovarian Syndrome Conference 85* (Endocrinol Metab Syndr 2015, 4:4, 2015). doi:<http://dx.doi.org/10.4172/2161-1017.C1.012>
4. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) | Human Reproduction | Oxford Academic. Available at: <https://academic.oup.com/humrep/article/19/1/41/690226>. (Accessed: 19th May 2020)
5. Webber, L. J. *et al.* Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet (London, England)* **362**, 1017–21 (2003).
6. Siu, M. K. Y. & Cheng, C. Y. The Blood-Follicle Barrier (BFB) in disease and in ovarian function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **763**, 186–192 (2013).
7. Zhou, H. *et al.* Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood-follicle barrier formation of mice revealed by ‘in vivo cryotechnique’. *Reproduction* **134**, 307–317 (2007).
8. Irving-Rodgers, H. F. & Rodgers, R. J. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Seminars in Reproductive Medicine* **24**, 195–203 (2006).
9. Tuck, A. R., Robker, R. L., Norman, R. J., Tilley, W. D. & Hickey, T. E. Expression and localisation of c-kit and KITL in the adult human ovary. *J. Ovarian Res.* **8**, 31 (2015).
10. 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. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13**, 137 (2015).
11. Casem, M. L. Exocytosis. in *Case Studies in Cell Biology* 193–215 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-801394-6.00008-7
12. Shimada, M. *et al.* Synaptosomal-Associated Protein 25 Gene Expression Is Hormonally Regulated during Ovulation and Is Involved in Cytokine/Chemokine Exocytosis from Granulosa Cells. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2487–2502 (2007).
13. Rothman, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55–63 (1994).
14. Choi, S. S., Jung, J. Y., Lee, D. H., Kang, J. Y. & Lee, S. H. Expression and regulation of SNAP-25 and synaptotagmin VII in developing mouse ovarian follicles via the FSH receptor. *J. Mol. Histol.* **44**, 47–54 (2013).

15. Arcos, A. *et al.* α -SNAP is expressed in mouse ovarian granulosa cells and plays a key role in folliculogenesis and female fertility. *Sci. Rep.* **7**, 11765 (2017).
16. Hong, W. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1744**, 120–144 (2005).
17. STX6 Gene - GeneCards | STX6 Protein | STX6 Antibody. Available at: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STX6#pathways_interactions. (Accessed: 27th May 2020)
18. STX6 - Syntaxin-6 - Homo sapiens (Human) - STX6 gene & protein. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/O43752#function>. (Accessed: 27th May 2020)
19. Jung, J. J., Inamdar, S. M., Tiwari, A. & Choudhury, A. Regulation of intracellular membrane trafficking and cell dynamics by syntaxin-6. *Bioscience Reports* **32**, 383–391 (2012).
20. Insler, V. & Lunenfeld, B. Polycystic ovarian disease: A challenge and controversy. *Gynecol. Endocrinol.* **4**, 51–70 (1990).
21. History of Discovery of Polycystic Ovary Syndrome. *Adv. Clin. Exp. Med.* **26**, (2017).
22. Stein, I. F. & Leventhal, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **29**, 181–191 (1935).
23. Stein, I. F., Cohen, M. R. & Elson, R. Results of bilateral ovarian wedge resection in 47 cases of sterility. Twenty-year end results: 75 cases of bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **58**, 267–274 (1949).
24. Gallagher, T. F. *et al.* Adrenocortical hyperfunction in idiopathic hirsutism and the Stein-Leventhal syndrome. *J. Clin. Invest.* **37**, 794–799 (1958).
25. Keettel, W. C., Bradbury, J. T. & Stoddard, F. J. Observations on the polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **73**, 954–965 (1957).
26. Rebar, R. *et al.* Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Invest.* **57**, 1320–1329 (1976).
27. Swanson, M., Sauerbrei, E. E. & Cooperberg, P. L. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. *J. Clin. Ultrasound* **9**, 219–222 (1981).
28. EL, M. The polycystic ovary syndrome. *Reprod Med.* **34**, 104–107 (1989).
29. Chang, R. J., Nakamura, R. M., Judd, H. L. & Kaplan, S. A. Insulin Resistance in Nonobese Patients with Polycystic Ovarian Disease*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**, 356–359 (1983).
30. Azziz, R. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 781–785 (2006).
31. Franks, S. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: In Defense of the Rotterdam

- Criteria. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 786–789 (2006).
32. Strandring, S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. (Elsevier, 2016).
 33. Gartner, L. P. *Textbook of Histology*. (Elsevier, 2017).
 34. Jay, V. A portrait in history. The legacy of Reinier de Graaf. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**, 1115–1116 (2000).
 35. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. (Wolters Kluwer Health, 2016).
 36. White, B. & Porterfield, S. *Endocrine and Reproductive Physiology*. (Elsevier Health Sciences., 2012).
 37. Ohno, N., Zhou, H., Terada, N. & Ohno, S. Permselectivity of blood-follicle barriers in mouse polycystic ovary model. in *In Vivo Cryotechnique in Biomedical Research and Application for Bioimaging of Living Animal Organs* 155–160 (Springer Japan, 2015). doi:10.1007/978-4-431-55723-4_29
 38. Rodgers, R. J. & Irving-Rodgers, H. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle fetal programming in the heifer-effects upon male reproductive development View project. (2014). doi:10.1530/rep.0.1260415
 39. Kobayashi, T. & Surani, M. A. On the origin of the human germline. *Dev.* **145**, (2018).
 40. Sasaki, K. *et al.* The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. *Dev. Cell* **39**, 169–185 (2016).
 41. Kanamori, M., Oikawa, K., Tanemura, K. & Hara, K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reproductive Medicine and Biology* **18**, 247–255 (2019).
 42. De Felici, M. The formation and migration of primordial germ cells in mouse and man. *Results Probl. Cell Differ.* **58**, 23–46 (2016).
 43. Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L. & Dekel, N. Ovarian folliculogenesis. *Results Probl. Cell Differ.* **58**, 167–190 (2016).
 44. Niu, W. & Spradling, A. C. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 20015–20026 (2020).
 45. Carré, G. A. & Greenfield, A. The gonadal supporting cell lineage and mammalian sex determination: The differentiation of Sertoli and granulosa cells. *Results Probl. Cell Differ.* **58**, 47–66 (2016).
 46. Mork, L. *et al.* Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol. Reprod.* **86**, (2012).

47. Zhang, H. & Liu, K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum. Reprod. Update* **21**, 779–786 (2015).
48. Adhikari, D. & Liu, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews* **30**, 438–464 (2009).
49. Liu, K. *et al.* Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr. Biol.* **24**, 2501–2508 (2014).
50. Sophie Jonard, D. D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum. Reprod. Updat.* **Vol.10**, 107–117 (2004).
51. Gougeon, A. Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects. in *The Ovary: Second Edition* 25–43 (Elsevier Inc., 2004). doi:10.1016/B978-012444562-8/50003-3
52. Williams, C. J. & Erickson, G. F. *Morphology and Physiology of the Ovary*. Endotext (MDText.com, Inc., 2000).
53. Duncan, W. C. Physiology of Ovulation. in *How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success* 1–21 (Cambridge University Press, 2019). doi:10.1017/9781316756744.001
54. El-Hayek, S. & Clarke, H. J. Control of oocyte growth and development by intercellular communication within the follicular niche. *Results Probl. Cell Differ.* **58**, 191–224 (2016).
55. Alam, M. H. & Miyano, T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reproductive Medicine and Biology* **19**, 13–23 (2020).
56. Pelland, A. M. D., Corbett, H. E. & Baltz, J. M. Amino acid transport mechanisms in mouse oocytes during growth and meiotic maturation. *Biol. Reprod.* **81**, 1041–1054 (2009).
57. Hutt, K. J., McLaughlin, E. A. & Holland, M. K. KIT/KIT Ligand in Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis: Roles in Rabbit and Murine Ovarian Follicle Activation and Oocyte Growth. *Biol. Reprod.* **75**, 421–433 (2006).
58. Ian N. Waldman & Legro, R. S. Polycystic Ovary Syndrome. in *The Ovary: Third Edition* (eds. LEUNG, P. C. K. & ADASHI, E. Y.) 415–435 (Elsevier, 2019).
59. Azziz, R. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstet. Gynecol.* **132**, 321–336 (2018).
60. Clinical manifestations of polycystic ovary syndrome in adults - UpToDate. Available at: https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-polycystic-ovary-syndrome-in-adults?search=pcos&topicRef=7385&source=see_link. (Accessed: 17th January 2021)

61. J., T. *et al.* Reduced expression of SCF in serum and follicle from patients with polycystic ovary syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **Vol. 20**, 5049–5057 (2016).
62. Jones, A. S. K. & Shikanov, A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *J. Biol. Eng.* **13**, 2 (2019).
63. Wendler, F. & Tooze, S. Syntaxin 6: The Promiscuous Behaviour of a SNARE Protein. *Traffic* **2**, 606–611 (2001).
64. Morré, D. J. Exocytosis, Endocytosis, And Recycling Of Membranes. in *Structure and Properties of Cell Membranes* 182–204 (CRC Press, 1985).
65. Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G. T. Secretory Membrane System and Golgi Apparatus. in *Cell Biology* 351–376 (Elsevier, 2017).
66. Wiser, O. *et al.* The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 248–253 (1999).
67. Liang, T. *et al.* SNAP23 depletion enables more SNAP25/calcium channel excitosome formation to increase insulin exocytosis in type 2 diabetes. *JCI Insight* **5**, (2020).
68. Marcheva, B. *et al.* A role for alternative splicing in circadian control of exocytosis and glucose homeostasis. *Genes Dev.* **34**, 1089–1105 (2020).
69. Kádková, A., Radecke, J. & Sørensen, J. B. The SNAP-25 Protein Family. *Neuroscience* (2018). doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.09.020
70. Branham, M. T., Mayorga, L. S. & Tomes, C. N. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 8656–8666 (2006).
71. Casarini, L. & Crépieux, P. Molecular mechanisms of action of FSH. *Frontiers in Endocrinology* **10**, 305 (2019).
72. Egbert, J. R. *et al.* Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone increase Ca²⁺ in the granulosa cells of mouse ovarian follicles[†]. *Biol. Reprod.* **101**, 433–444 (2019).
73. Zorec, R. SNARE-mediated vesicle navigation, vesicle anatomy and exocytotic fusion pore. *Cell Calcium* **73**, 53–54 (2018).
74. Peak, T. C., Su, Y., Chapple, A. G., Chyr, J. & Deep, G. Syntaxin 6: A novel predictive and prognostic biomarker in papillary renal cell carcinoma. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
75. Wendler, F. & Tooze, S. Syntaxin 6: The Promiscuous Behaviour of a SNARE Protein. *Traffic* **2**, 606–611 (2001).
76. Reverter, M. *et al.* Cholesterol Regulates Syntaxin 6 Trafficking at trans-Golgi Network Endosomal Boundaries. *Cell Rep.* **7**, 883–897 (2014).
77. Jung, J. J., Inamdar, S. M., Tiwari, A. & Choudhury, A. Regulation of intracellular membrane trafficking and cell dynamics by syntaxin-6. *Bioscience Reports* **32**, 383–

- 391 (2012).
78. Martín-Martín, B., Nabokina, S. M., Blasi, J., Lazo, P. A. & Mollinedo, F. Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood* **96**, 2574–2583 (2000).
 79. Graham, M. E. *et al.* Structure-function study of mammalian Munc18-1 and *C. elegans* UNC-18 implicates domain 3b in the regulation of exocytosis. *PLoS One* **6**, (2011).
 80. STXBP1 - Syntaxin-binding protein 1 - Homo sapiens (Human) - STXBP1 gene & protein. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/P61764>. (Accessed: 21st February 2021)
 81. Zhang, K. *et al.* CASK, APBA1, and STXBP1 collaborate during insulin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* **520**, 111076 (2021).
 82. Oh, E., Kalwat, M. A., Kim, M. J., Verhage, M. & Thurmond, D. C. Munc18-1 regulates first-phase insulin release by promoting granule docking to multiple syntaxin isoforms. *J. Biol. Chem.* **287**, 25821–25833 (2012).
 83. Campbell, J. R. *et al.* Essential role of syntaxin-binding protein-1 in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinol. (United States)* **161**, (2020).
 84. Tang, B. L. SNAREs and developmental disorders. *J. Cell. Physiol.* **236**, 2482–2504 (2021).
 85. Katoh, M. *et al.* Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR). in *Encyclopedia of Signaling Molecules* 643–650 (Springer New York, 2012). doi:10.1007/978-1-4419-0461-4_585
 86. Simoni, M., Gromoll, J. & Nieschlag, E. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology*. *Endocr. Rev.* **18**, 739–773 (1997).
 87. Garcia-Velasco, J. A. *et al.* FSH receptor in vitro modulation by testosterone and hCG in human luteinized granulosa cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **165**, 259–264 (2012).
 88. Thomas, F. H. & Vanderhyden, B. C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: Regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* **4**, 19 (2006).
 89. Calebiro, D. & Godbole, A. Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **32**, 83–91 (2018).
 90. Sayers, N. & Hanyaloglu, A. C. Intracellular Follicle-Stimulating Hormone Receptor Trafficking and Signaling. *Frontiers in Endocrinology* **9**, 653 (2018).
 91. Lin, Y. *et al.* SNARE-Mediated Cholesterol Movement to Mitochondria Supports Steroidogenesis in Rodent Cells. *Mol. Endocrinol.* **30**, 234–47 (2016).

92. İnfertilite ve Genetik Yönü. Available at: <https://dijitalakademi.turkiyeklinikleri.com/flippage/tibbi-genetik-ozel/4-3/tr-index.html#p=20>. (Accessed: 25th April 2021)
93. Golos, T. G., Soto, E. A., Richard, S., Tureck, W. & Strauss, J. F. Human Chorionic Gonadotropin and 8-Bromo-Adenosine 3'5'-Monophosphate Stimulate [125 I]Low Density Lipoprotein Uptake and Metabolism by Luteinized Human Granulosa Cells in Culture*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **61**, 633–638 (1985).
94. Zırh, S. *et al.* A new isolation and culture method for granulosa cells. *Cell Tissue Bank.* (2021). doi:10.1007/s10561-021-09929-5
95. Grosse, J. *et al.* Synaptosome-Associated Protein of 25 Kilodaltons in Oocytes and Steroid-Producing Cells of Rat and Human Ovary: Molecular Analysis and Regulation by Gonadotropins1. *Biol. Reprod.* **63**, 643–650 (2000).
96. Costello, M. F. *et al.* Evidence summaries and recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome: assessment and treatment of infertility. *Hum. Reprod. Open* **2019**, 1–24 (2019).
97. Do, Y. S. *et al.* Human ovarian theca cells are a source of renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1957–1961 (1988).
98. Kranc, W. *et al.* 'Heart development and morphogenesis' is a novel pathway for human ovarian granulosa cell differentiation during long-term in vitro cultivation-a microarray approach. *Mol. Med. Rep.* **19**, 1705–1715 (2019).
99. Szilágyi, A. *et al.* Low-dose ovulation induction with urinary gonadotropins or recombinant follicle stimulating hormone in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **18**, 17–22 (2004).
100. Wang, X. *et al.* Membrane location of syntaxin-binding protein 1 is correlated with poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* **250**, 263–270 (2020).
101. Olesen, C. *et al.* Global gene expression analysis in fetal mouse ovaries with and without meiosis and comparison of selected genes with meiosis in the testis. *Cell Tissue Res.* **328**, 207–221 (2007).
102. Shim, U. *et al.* Pathway analysis based on a genome-wide association study of polycystic ovary syndrome. *PLoS One* **10**, (2015).
103. Kim, B. U. *et al.* Munc18 Plays an Important Role in the Regulation of Glutamate Release during Female Puberty Onset. *Mol. Cells* **22**, 30–35
104. Lim, J. J., Lima, P. D. A., Salehi, R., Lee, D. R. & Tsang, B. K. Regulation of androgen receptor signaling by ubiquitination during folliculogenesis and its possible dysregulation in polycystic ovarian syndrome. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

105. Cho, S. J., Cho, J. & Jena, B. P. The number of secretory vesicles remains unchanged following exocytosis. *Cell Biol. Int.* **26**, 29–33 (2002).
106. Melo, R. C. N., Dvorak, A. M. & Weller, P. F. Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. in *Microscopy and Microanalysis* **16**, 653–660 (NIH Public Access, 2010).
107. Toonen, R. F. *et al.* Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J.* **25**, 3725–3737 (2006).