



**NİKOTİNAMİD MONONÜKLEOTİD (NMN) VE
NİKOTİAMİD RİBOZİD (NR) İLE MİTOKONDİRİYAL
STRES İNHİBİSYONUNUN DHEA İLE İNDÜKLENMİŞ
POLİKİSTİK OVER SENDROMLU RATLARDA
ANOVULASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeliha YETİM

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ

Doktora Tezi-2021

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

**NİKOTİNAMİD MONONÜKLEOTİD (NMN) VE
NİKOTİAMİD RİBOZİD (NR) İLE MİTOKONDRIYAL
STRES İNHİBİSYONUNUN DHEA İLE İNDÜKLENMİŞ
POLİKİSTİK OVER SENDROMLU RATLARDA
ANOVULASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeliha YETİM

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi
Tez Danışmanı
Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ**

**Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi'nin 01/03/2021 tarih ve TDK-2021-8914 proje nolu kararı ile
desteklenmiştir.**

**ERZURUM
2021**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Polikistik Over Sendromu.....	4
2.1.1. Polikistik Over Sendromunun Tanımı ve Tarihçesi	4
2.1.2. PKOS'un Prevalansı	5
2.1.3. PKOS'un Tanı Kriterleri.....	5
2.1.4. PKOS' ta Klinik.....	6
2.1.5. PKOS'un Fiziopatolojisi	8
2.1.5.1. Hipotalamo-Hipofizer Disfonksiyon	9
2.1.5.2. Egzajere Adrenarş.....	10
2.1.5.3. İnsülin Direnci	10
2.1.5.4. Obezite	11
2.1.5.5. PKOS Genetiği	11
2.1.5.6. Over Patolojisi	11
2.2. Mitokondriyon	13
2.2.1. Mitokondriyonun Yapı ve Özellikleri.....	13
2.2.2. Mitokondri İç Dinamikleri	15

2.2.3. Mitokondriyal Fisyon	16
2.2.4. Mitokondriyal Füzyon	18
2.2.5. PKOS ve Mitokondriyal Stres	19
2.3. Sirtuinler	20
2.3.1. Sirtuin1 (SIRT1)	21
2.4. Nikotinamid Mononükleotid.....	22
2.5. Nikotinamid Ribozid.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Hayvan Etik Kurul Onayı	25
3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	25
3.3. Deney Grupları	25
3.4. Polikistik Over Modeli.....	25
3.5. İlaç Uygulama Prosedürü.....	26
3.6. Sıçanlarda Vajinal Smear Değerlendirilmesi.....	26
3.7. Deneyin Sonlandırılması.....	26
3.8. FSH ve LH ELISA Ölçüm Basamakları.....	26
3.9. Leica TP 1050 Doku Takibi Cihazı Basamakları	27
3.10. Hematoksilen ve Eozin Boyama Prosedürü.....	28
3.11. Folikül Sayımı Yöntemi.....	29
3.12. Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi	29
3.12.1. Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu	29
3.12.2. Total RNA'nın Spektroskopik Olarak Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Saflığının Kontrolü	30
3.12.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	30
3.12.3. Eş Zamanlı Quantitatif PCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonlarının Analizi	30

3.13. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	31
3.14. İstatiksel Analizler	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları.....	35
4.2. Serum FSH ve LH Bulguları	36
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	38
4.3.1. Hematoksilen ve Eozin Boyama Bulguları.....	38
4.3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	42
4.4. Moleküler Bulgular.....	49
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	86
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	86
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	87
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	88

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca katkılarından dolayı anabilim dalımız öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Tuba Demirci ve çalışmadaki dokuların elektron mikroskopik açıdan değerlendirilmesinde emeği olan Sayın Öğr. Görevlisi Özgen Vuraler'e, Prof. Dr. Mesut Taşkın'a, Doç. Dr. Tolga Mercantepe'ye; bu çalışmanın tamamlanmasında her daim desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Pınar Arslan'a, Dr. Öğr. Üyesi Erdem Toktay'a, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZGÜL ABUÇ'a, Arş. Gör. Muhammet Ali GÜRBÜZ'e, Uzm. Dr. Raziye ALACA'ya, Arş. Gör. Dr. Merve Durmuş Kaygısız'a, teknisyen İbrahim Günay'a; ayrıca doktora tez çalışmamın yürütülmesinde bana fırsat oluşturan Yüksek Öğrenim Kurumuna (YÖK), bu çalışmayı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline ve yoğun iş ve eğitim hayatım boyunca sabırla beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Zeliha YETİM

ÖZET

Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotinamid Ribozid (NR) ile Mitokondriyal Stres İnhibisyonunun DHEA ile İndüklenmiş Polikistik Over Sendromlu Ratlarda Anovulasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada deneysel PKOS modelinde granüloza hücrelerinde oluşan mitokondriyal stres ve buna bağlı anovulasyon üzerine NMN ve NR'nin tedavi edici etkilerinin olup olmadığını araştırmak amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmada, ağırlıkları 40-60 gram arasında değişen 21 günlük 20 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu haricindekilere 21 gün boyunca Dehidroepiandrosteron (DHEA) verilerek PKOS modeli oluşturuldu. NMN grubuna 17 gün 500 mg/kg intraperitoneal olarak NMN, NR grubuna 7 gün oral olarak 200 mg/kg NR uygulandı. Sıçanlar 37. gün sakrifiye edildi ve alınan overler histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirildi. Mitokondriyal dinamikleri değerlendirmek için Drp1, Mfn1 ve Mfn2 gen ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile tespit edildi.

Bulgular: LH/FSH oranı PKOS grubunda yüksekti, fakat NR ve NMN gruplarında kontrol grubu deneklerinin değerlerine yakındı. Histolojik kesitlerde PKOS grubunda fazlasıyla kistik yapı mevcuttu, apoptotik hücreler mevcutken teka hücre tabakasında kalınlaşmalar mevcuttu. NMN ve NR gruplarında ise bu hasarların önemli ölçüde azaldığı, gözlemlendi. İmmünohistokimyasal değerlendirmede PKOS grubunda Drp1 pozitifliği yoğunken kontrol, NMN ve NR gruplarında ise Mfn1 pozitifliği yoğun idi. Mfn2 pozitifliği tüm gruplarda orta derecede izlendi. RT-PCR analizlerinde PKOS grubunda Drp1'in arttığı, Mfn1'in azaldığı görülürken, NMN ve NR uygulanan gruplarda Drp1'in azaldığı, Mfn1'in ise yükseldiği görüldü. Gruplar arasında Mfn2 ekspresyonları açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı.

Sonuç: Bu sonuçlar NMN ve NR'nin PKOS modelinde meydana gelen mitokondri stresini inhibe edebileceğini ve anovulasyon üzerine iyileştirici etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: anovulasyon, mitokondri stresi, NMN, NR, PKOS

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Mitochondrial Stress Inhibition with Nicotinamide Mononucleotide (NMN) and Nicotinamide Riboside (NR) on Anovulation in Rats with DHEA-Induced Polycystic Ovary Syndrome

Aim: In this study, it was aimed to investigate whether NMN and NR have therapeutic effects on mitochondrial stress related anovulation in granulosa cells in an experimental PCOS model.

Material and method: In the study, 20 female Sprague-Dawley rats (21 days old) with an average weight of 40-60 grams were used. They were randomly divided into 4 groups. The PCOS model was created by Dehydroepiandrosterone (DHEA) induction for 21 days in the non-control group. NMN was administered 500 mg/kg intraperitoneally for 17 days to the NMN group, and 200 mg/kg NR was administered orally to the NR group for 7 days. The rats were sacrificed on the 37th day and ovarian tissues were evaluated histopathologically, immunohistochemically and biochemically. To assess mitochondrial dynamics, Drp1, Mfn1 and Mfn2 gene expression levels were detected by RT-PCR.

Results: The LH/FSH ratio was high in the PCOS group, but the ratio of NR and NMN groups was close to the values of control group ratio. In histological sections, the PCOS group had a very cystic structure, apoptotic cells were available and there were thick theca cell layers. It was observed that these damages were significantly reduced in the NMN and NR groups. In the immunohistochemical evaluation, while Drp1 positivity was intense in the PCOS group, Mfn1 positivity was intense in the control, NMN and NR groups. Mfn2 positivity was moderate in all groups. In RT-PCR analysis, it was observed that Drp1 increased and Mfn1 decreased in PCOS group, while Drp1 decreased and Mfn1 increased in NMN and NR applied groups. There was no statistical significance between the groups in terms of Mfn2 expressions.

Conclusion: These results show that NMN and NR can inhibit mitochondrial stress in the experimental PCOS model and have ameliorative effects on anovulation.

Key Words: anovulation, mitochondrial stress, NMN, NR, PCOS

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	:	Adenozin trifosfat
Ca⁺²	:	Kalsiyum
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
E2	:	Östradiol
DHEA	:	Dehidroepiandrosteron
Drp1	:	Dynamin-ilışkili protein 1
Fis1	:	Mitokondriyal fisyon protein 1
FOXO	:	Forkhead box
FSH	:	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GTP	:	Guanozin tri fosfat
GTPaz	:	Guanozin tri fosfataz
IGF	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP-1	:	IGF-1 inhibe edici insülin benzeri bağlacı protein 1
LH	:	Lüteinleştirici hormon
Mff	:	Mitokondriyal fisyon faktörü
Mfn1	:	Mitofusin 1
Mfn2	:	Mitofusin 2
mtDNA	:	Mitokondriyal DNA
NAD⁺	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Hidrit
NAMPT	:	Nikotinamid fosforibosiltransferaz
NMN	:	Nikotinamid Mononükleotit
NO	:	Nitrik oksit
NR	:	Nikotinamid Ribozid
OPA1	:	Optik Atrofi 1

PGC1 alfa	:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PKOS	:	Polikistik over sendromu
SAM	:	Sorting and assembly machinery
SHBG	:	Seks Hormonu Bağlayıcı Globülin
SIRT1	:	Sirtuin 1, Silent Information Regulator 1
TIM	:	Translocase of the inner membrane
TOM	:	Translocase of the outer membrane



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1. Kontrol, PKOS, NR ve NMN gruplarına ait kilo artışı grafiği.	35
Şekil 4.2. Gruplara ait serum LH seviyesi.....	36
Şekil 4.3. Gruplara ait serum FSH seviyelerindeki değişimleri gösteren grafik.	37
Şekil 4.4. Gruplara ait LH/FSH oranlarını gösteren grafik	37
Şekil 4.5. Kontrol grubna ait H-E kesitler.	38
Şekil 4.6. PKOS grubu H-E kesitleri.....	39
Şekil 4.7. NR grubu H-E kesitleri.....	40
Şekil 4.8. NMN grubu H%E kesitleri.....	41
Şekil 4.9. Gruplara ait antral folikül sayısını gösteren grafik.....	41
Şekil 4.10. Mfn1 primer antikoru ile inkube edilmiş over dokusuna ait kesitler.	44
Şekil 4.11. Mfn2 primer antikoru ile inkube edilmiş over dokusuna ait kesitler	46
Şekil 4.12. Drp1 primer antikoru ile inkube edilmiş over dokusuna ait kesitler.....	48
Şekil 4.14. Mfn1 geninin ekspresyon değişimlerini gösteren grafik.....	50
Şekil 4.15. Mfn2 geninin ekspresyon değişimlerini gösteren grafik.....	51

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Over foliküllerinin sınıflandırılması	29
Tablo 3.2. Genlerin ileri ve geri primer sekansları	31
Tablo 3.3. İmmünohistokimya boyama prosedürü	32
Tablo 3.4. Over dokularının immünopozitivite skorlama tablosu	33
Tablo 4.1. Over dokularının immünopozitivite skorlama sonucu.....	43



1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) dişi üreme endokrinolojisinin toplumda sık görülen bir bozukluğudur. Bu bozukluk hiperandrojenizm, infertilite, kronik anovulasyon, endometrium ve over kanseri, hirsutizm ile seyreden ve artmış insülin direnci, Tip 2 Diyabetes Mellitus, kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklara sebep olabilen endokrinolojik ve metabolik bir hastalıktır.¹⁻⁴ Bu hastalarda hastalarda ovulasyonun gerçekleşmemesi ve korpus luteum oluşmamasından ötürü progesteron seviyeleri düşüktür. Düşük progesteron seviyeleri hipofiz hormon salınım amplitüdü ve frekansını artırarak lüteinleştirici hormon (LH) salınımında artışa, folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımında baskılanmaya sebep olur.⁵⁻⁸ Artan LH/FSH oranı yumurtalıklarda LH reseptörlerine sahip teka hücrelerinde androjen üretilmesini artırırken, FSH reseptörlerine sahip granüloza hücrelerinde mitozun durmasına ve apoptotik hücre ölümüne neden olur.⁹ Yüksek LH/FSH oranı ve androjenlerin kronik anovulasyona sebep olduğu bilinen bir gerçektir fakat bu süreci hangi mekanizmaların başlattığı tam olarak çözülememiştir. Bu patolojik sürecin başlangıcı ile ilgili literatürde birçok mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlardan bir kaçı hiperinsülinemiye bağlı teka hücrelerinde androjen üretiminin artması, overlerde düşük yoğunluklu kronik inflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin artması, foliküler hücrelerde azalan adenosin trifosfat (ATP) üretimi ve artan apoptotik hücre ölümüdür.¹⁰⁻¹⁴ Bu mekanizmaların çoğunlukla granüloza ve teka hücrelerindeki mitokondrilerin fonksiyonlarıyla ilişkili olma ihtimali, son yıllarda PKOS etiyojisinde mitokondriyal stresi önemli bir araştırma konusu haline getirmiştir.^{15, 16} Literatürde PKOS ile ilişkili olarak over dokusunda mitofaji, otofaji ve apoptotik hücre ölümü iyi bir şekilde anlaşılmasına rağmen bu patolojik süreçlerle kuvvetli ilişkili olan mitokondriyal fisyon ve füzyon dinamikleri yeterince araştırılmamıştır.^{17, 18}

Mitokondriler hücredeki birincil enerji jeneratörleridir ve aynı zamanda serbest radikallerin ana kaynağı ve hedefidirler.¹⁹ Mitokondriyal kalite; mitokondriyal deoksiribo nükleik asit (DNA), lipidler, proteinler ve metabolitlerin karışmasına izin veren mitokondriyal füzyon ve mitokondrinin mitofajiyle seçici olarak çıkarılmasını sağlayan mitokondriyal fisyon ile korunur.¹⁸ Mitokondriyal stresin şiddetlenmesine bağlı olarak mitokondriyal fisyon ve füzyon homeostazının bozulması folikül mikroçevresinde apoptozu uyarak hem folikül gelişiminin durmasına hem de oosit kalitesinin azalmasına; dolayısıyla ovulasyonda bozukluklara veya infertiliteye neden olur.^{18, 20} Mitokondriyal fisyon ve füzyon homeostazı, sağlıklı foliküler gelişimin sürdürülmesi için çok önemlidir ve farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda bu dengenin bozulması sonucu granuloza hücrelerinde azalan proliferasyon ve azalan apoptoza direnç ile oositte çoklu organel agregasyonları, mitokondriyal deformiteler ve folikül büyümesinin durması gibi patolojiler tespit edilmiştir.^{14, 18, 21}

Nikotinamid Mononükleotit (NMN) ve Nikotinamid Ribozid (NR) B3 vitamini metabolitidirler ve hücresel enerji kaynağı olarak bulunurlar.²² Nikotinamid mononükleotitin NAD^+ / $NADH$ (Nikotinamid Adenin Dinükleotit / Nikotinamid Adenin Dinükleotit Hidrit) oranını normalleştirdiği ve buna bağlı olarak mitokondriyal fisyon ve füzyon homeostazının sürdürülmesinde rolü olduğu bilinen bir gerçektir.²² NR, NAD^+ öncüsü olarak işlev görür ve çeşitli fizyolojik işlemlere aracılık eder.²³ Nikotinamid mononükleotit veya nikotinamid ribozid ile tedavi edilen farelerde, artmış NAD^+ seviyesinin, Sirtuin1'e (SIRT1) bağlı olarak mitokondriyal fonksiyonu geliştirdiği ve metabolik hasara karşı koruduğu ortaya çıkmıştır.²⁴⁻²⁸

Bu tez çalışmasında, PKOS patogeneğinde granuloza hücrelerinde görülen mitokondri stresi üzerine NMN ve NR ile foliküllerde mitokondriyal fisyon ve füzyon homeostazının sürdürülmesi ve bu maddelerin anovulasyon üzerine iyileştirici

etkilerinin araştırması hedeflenmiştir. Bu amaçla androjenize edilerek PKOS modeli oluşturulmuş sıçanlarda, NMN ve NR ile granüloza hücrelerindeki mitokondriyal dinamikleri modüle ederek bu maddelerin anovulasyon üzerine iyileştirici etkilerinin tespiti ve moleküler yollarının aydınlatılması, böylece tanı ve tedavide yeni umutların doğması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu

2.1.1. Polikistik Over Sendromunun Tanımı ve Tarihçesi

Polikistik over sendromu (PKOS) olağan olarak ergenlik döneminde olmak üzere üreme çağıının her hangi bir döneminde görülebilen, kronik, etiyolojisi bilinmeyen, heterojen etiyolojisi olduğu düşünülen, menstrüel düzensizlik, kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm (sivilce, erkek tipi saç dökülmesi ya da hormonal olarak artmış serum androjen konsantrasyonu) gibi belirtiler gösteren ve Cushing sendromu, hiperprolaktinemi, tiroid hastalığı ve androjen üreten tümörler gibi diğer faktörlerle ayırıcı tanısı yapılması gereken bir klinik tablo şeklinde tanımlanmaktadır. Polikistik over sendromunda, 12 ya da daha fazla sayıda 2-9 milimetre çapında değişen çatlamamış folikülleri içeren ovver yapıları mevcuttur.^{1, 2, 29-32}

Polikistik over sendromu santral sinir sistemi, hipofiz, yumurtalıklar, adrenal bezler ve ekstrasitenduler dokular arasındaki ilişkilerin bozulması nedeniyle ortaya çıkar.^{33, 34} Kronik anovulatuvar kadın infertilitesinin en sık nedeni olan PKOS multisistemik, reproduktif ve endokrin bir sendrom olarak Tip II diyabet, kardiyovasküler sistem hastalıkları, dislipidemi ve endometriyum kanseri gibi uzun dönem ciddi sağlık sorunları ile de ilişkisi olabilen önemli bir sağlık sorunudur.³¹

Geçmişinde oldukça eskiye dayanan PKOS'un bilinen en eski hastaları M.Ö. 470-366 yılları arasında erkeksi kadınlar olarak tanımlanan ve PKOS belirtileri gösteren bireylerdir. 1844'te bazı hastaların yumurtalıklarında kistik yapılar izlenmiştir. Bu hastalıkla ilgili yayınlanmış ilk çalışma 1935'te Stein ve Leventhal'in yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada genişlemiş çok sayıda kist içeren overleri olan, kıllanma sorunu ve oligo-amenore şikayetleri bulunan 7 kadında ilk kez kistik overler ile ilgili sendromik sorunlar incelenmiştir.^{35, 36} 1958'de PKOS'lu kadınlarda serum androjen

seviyesinin oldukça yüksek olduğu fark edilmiş ve 1980’de insülin direncinin PKOS’u indükleyici etkisi bilime kazandırılmıştır. 1981’de ultrason ile gözlenen kistik yapılar göze çarpmış ve 1985 yılında kistler tanı kriteri olarak kabul görmüştür. Polikistik over sendromunun net olarak tanımlanması ve kistaslarının oluşturulması 1990 yılında National Institute of Health tarafından gerçekleştirilmiş ve 2003 yılında Rotterdam konferansında tekrar düzenlenmiştir.^{31, 37}

2.1.2. PKOS’un Prevalansı

Polikistik over sendromunun görülme sıklığı ülkelere göre değişken bir tablo gösterebilir. Bunun nedeni klinik ve biyokimyasal özelliklerin, ırk ve etnik kökene göre farklılık göstermesi, tanı kriterlerinde fikir birliği sağlanamaması ve hormonal değişimlerdeki farklılıklar olabilir. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) ölçütlerine göre PKOS’un toplumda görülme sıklığı %7-8,7 iken, Rotterdam ölçütlerine göre bu oran %18, Androgen Excess Society (AES) ölçütlerine göre %12 civarındadır.^{38, 39} Prevalans yaşa göre de değişkenlik göstermekte olup genç kadınlarda, 35 yaş üstü kadınlara göre daha yüksek olabilir.⁴⁰ Obezite bu oranı %28’lere yükseltmektedir.⁴¹

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO-II) ovulasyon bozukluğu olan hastalar üzerinde yaptığı kohort çalışmasında, PKOS prevalansının Rotterdam kriterlerine göre %60, NIH kriterlerine göre ise %55 olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durum Türkiye nüfusuna oranlandığında neredeyse 1 milyon PKOS hastası olduğu tahmin edilebilmektedir. Diğer ölçütler özellikle de Rotterdam ölçütleri kullanıldığında bu oran %20-60 civarına yükselmektedir.^{38, 42}

2.1.3. PKOS’un Tanı Kriterleri

Polikistik over sendromu çeşitli bozuklukların ve genetik etkenlerin sinerjistik etkisi sonucu meydana geldiği düşünülen multifaktöriyel bir hastalıktır. Şimdiye kadar PKOS ile ilgili pek çok çalışma yapılmasına rağmen etiyolojisi hala belirsizdir.⁴³

Polikistik over sendromu ile ilgili bir çok tanım yapılmış ve tıbbi tanıyı mutlak olarak çizen sınırlar kesin olarak ortaya konulamamıştır. Son yıllarda PKOS için yapılan 3 temel tanımlama;

1- 1990'da National Institute of Health (NIH):

- Kronik anovulasyon

-Klinik ya da biyokimyasal hiperandrojenizm (Diğer nedenler elendikten sonra yukardaki iki kıstasın olması tanı için yeterlidir).⁴⁴

2- 2003'te European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ve American Society for Reproductive Medicine (ASRM)

(2003 Rotterdam Ölçütleri):

-Oligo/anovulasyon ,

-Hiperandrojenizm,

-Polikistik over morfolojisi ,

Cushing sendromu, non-klasik adrenal hiperplazi, over-adrenal tümörler gibi nedenler elendikten sonra yukardaki üç kıstastan ikisi tanı için yeterlidir.³¹

3- 2006'da Androgen Excess Society (AES):

- Hiperandrojenizm (Hirşutizm veya hiperandrojenemi),

-Overlerin işlev bozukluğu ya da polikistik overler.⁴⁵

2.1.4. PKOS' ta Klinik

Belirtiler menarşla başlamakta fakat hastalığın seyrini çeşitli faktörler etkilemektedir. Özellikle erken yaşlarda menstrüel düzensizlikler çok fazla olmakta, daha ileri yaşlardaysa hirşutizm ve infertilite ön planda olmaktadır. ^{12, 46, 47}

Polikistik over sendromunda esas bulgu anovulasyon olup düzensiz menstrüel siklus, oligomenore veya amenore şeklindedir. Sürekli anovulasyon infertilite, amenore veya disfonksiyonel kanama gibi çeşitli menstrüel kanama problemleri, hirşutizm,

sivilce, endometrium kanseri ve meme kanseri riskinde artış, kardiovasküler sistem hastalıklarında artış gibi hastalık ve rahatsızlıklara yol açabilmektedir.⁴⁶⁻⁵⁰

Polikistik over sendromunda menstrüel bozukluk düzensiz, uzun aralıklarla kanama veya adet kanamasının olmaması şeklindedir. Anovulatuvar kanamalar için tipik olan, premenstrüel belirtilerin öncülük etmediği, beklenmeyen kanamalar meydana gelmesidir. Kanama genellikle fazla değildir, fakat belirgin endometrial hiperplazisi olan hastalarda anemi, ortostatik hipotansiyon gelişebilecek kadar fazla miktarda meydana gelebilir.⁵¹⁻⁵³ Oligomenore, peripubertal başlangıçlı ve menarştan itibaren yılda 6 defadan az adet görme şeklinde tanımlanmıştır. Amenore ise, gebelik yoksa 3 ay veya daha fazla süre adet kanamasının olmamasıdır.^{54, 55} Polikistik over sendromunda yaklaşık %20 oranında amenore görülürken, vakaların %5-10'unda adetler düzenlidir. Ek olarak, nedeni bilinmeyen PKOS'ta hastaların geç üreme dönemlerinde adetleri düzenli hale gelebilmektedir.^{56, 57}

Polikistik over sendromundandaki bir başka bulgu da hiperandrojenizmdir.^{11, 58} Bunun en yaygın belirtisi hirsütizm olmakla birlikte sebore, sivilce, alopesi ya da hidroadenitis süpürativa da görülebilir. Hirsütizm, kadınlarda kıllanmanın normalde çok az olduğu ya da hiç olmadığı androjene bağımlı bölgelerde koyu ve kalın kılların artması olarak ifade edilir. Kadınların ortalama %70'inde hirsütizm görülürken, daha azı ise sivilcelidir.^{29, 47, 51} Polikistik over sendromu tanısı konmuş olguların %40-60'ı obez, % 60-90'ı hirsüt, % 50-90'ı amenoreiktir. %55-70'inde kısırlık sorunu vardır.^{42, 58-}

60

Polikistik over sendromunda kısırlığın ana sebebi anovulasyondur.^{61, 62} Polikistik over sendromlu kadınlarda PKOS olmayanlara göre daha fazla düşük yapma riski olduğu görülmüştür. Bu neticenin PKOS'taki yüksek luteinleştirici hormon seviyesi

sonucunda bozulmuş oosit ve embriyo kalitesine bağı olabileceğı düşünölmektedir.^{42, 61,}

63

Polikistik over sendromlu kadınlar normal kadınlara oranla daha obezdirler.^{10, 59} Adipoz dokuda, aktif steroid üretimi gerçekleşmekte olup önemli androjenler östrojenlere (aromataz aktivitesi), östradiol östrona ve dehidroepiandrostenedion androstenediole çevrilmektedir. Araştırmalar; artmış vücut kitle indeksi ile kısırlık insidansında artış olduğunu göstermektedir.⁶⁴

2.1.5. PKOS'un Fizyopatolojisi

Olağan menstrüel döngüde menstruasyondan hemen önce ve menstrüasyon esnasında östrojen, progesteron ve inhibinin negatif geribildirimini biter ve ardından hipofizden FSH salınımı artar. Bu artma foliküler gelişim ve steroidogenez için mecburidir. Folikülün gelişmesiyle folikül içinde meydana gelen otokrin-parakrin etkenler FSH'ya olan foliküler duyarlılığı sürdürür.⁶⁵ Bu da folikülün mikro çevresindeki androjenik üstünlüğün östrojenik üstünlüğe dönüşmesini sağlar. Aktivin ile FSH'nın beraber etki göstermesi, yumurtlama ve luteinizasyon için mecburi olan, granuloza hücreleri üzerinde bulunan luteinizan hormon reseptörlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Serum östradiol (E2) düzeyinin birden yükselmesi ovulasyonu tetikler.^{65, 66} Hipofizin ön lobu ve büyük ihtimalle hipotalamus üzerinde oluşturulan bir pozitif geribildirim ile döngü ortasında luteinleştirici hormon salınımı, yumurtanın atılması ve korpus luteumun meydana gelmesi sağlanır. Ovulasyon ile birlikte östradiol seviyesinde ikinci bir yükselme ve progesteronun artması ile beraber düşük LH ve FSH seviyeleri ile 14 günlük luteal faz meydana gelir. Korpus luteumun işlevini kaybetmesi ile hormon seviyeleri düşer, folikül uyarıcı hormon yükselmeye başlar ve yeni bir döngü başlar.⁶⁵

Polikistik over sendromunun fizyopatolojisi hakkında literatürde bilgi olmasına rağmen etyolojisi henüz aydınlatılamamıştır. Zamanla birçok bilim adamı sendromun kendi bileşenlerine ek olarak metabolik, nöroendokrin ve adrenal bez anormalliklerinin de eşlik ettiğini ispatlanmış fakat PKOS'ta altta yatan patofizyolojik mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır. Polikistik over sendromu birkaç sistemin çalışmasındaki kusurların sinerjik etkisi ile meydana gelen, çok etkenli bir hastalık olarak düşünülebilir. Bu patogenezdaki olaylar hipotalamo-hipofizer disfonksiyon, egzajere adrenarş, insülin direnci, obezite, genetik faktörler ve over patolojisidir.^{3, 34, 67-69}

2.1.5.1. Hipotalamo-Hipofizer Disfonksiyon

Menstrual döngünün gerçekleşmesi için hipotalamik arkuat çekirdekten gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) düzenli aralıklarla salınımı gerekir. Bu hormon ön hipofizden gonadotropin (LH ve FSH) salgılatır. FSH ve LH yumurtalıklarda östrojen ve progesteron döngüsünü düzenler.^{70, 71} Luteinleştirici hormon salınımı foliküllerdeki teka hücrelerinden androjen öncüllerinin salınımını sağlar. FSH tarafından uyarılan granüloza hücreleri aromataz etkisi ile bu androjen öncüllerini östrojene dönüştürür. Östrojen miktarının yükselmesi bir folikülün olgunlaşmasını başlatır, daha sonra negatif geribildirim mekanizmasını çalıştırır ve FSH baskılanır.^{71, 72} Polikistik over sendromlu kadınlardaki anovulasyonda, gonadotropin salgılanmasında bozukluk vardır. Sürekli yüksek seviyelerdeki serbest östrojen doğrudan gonadotropin üretimine etki ederek GnRH'nın kendi GnRH reseptörlerini sayıca çoğaltarak hipofizer duyarlılığı arttırabilir. Gonadotropin salgılatıcı hormonun düzenli salınımındaki değişiklikler, FSH'ya oranla LH'nın baskın üretilmesine sebep olur.^{70, 73} Luteinleştirici hormon, yumurtalıklarda androjen üretimini uyarırken, göreceli FSH düşüklüğü granüloza hücrelerinde aromataz enziminin uygun bir şekilde uyarılmasını engeller ve 5-alfa-redüktaz yolağının başlatılmasına sebep olur. Dolayısıyla androjenin etkin

östrojen olan östradiole dönüşmesi azalır.⁷⁴ Yüksek serum androjenleri (özellikle androstenedion), periferde östrojenlere, öncelikle östrona, dönüşür. Bu şekilde yani 5-alfa-redüktaz yolağının sonunda oluşan östrojen, FSH'yı yeterince baskılayamaz ve foliküllerin gelişimi devam eder.⁷⁴ Fakat sağlıklı olmayan gelişim süreci yüzünden foliküller 2-5 mm çapında kalırlar ve kistik yapıları oluştururlar.^{13, 75, 76} Östrojenin bu şekildeki dönüşümü öncelikle yağ dokusunun stromal hücrelerinde meydana geldiğinden östrojen üretimi PKOS'lu obez kadınlarda daha sık görülür. Yüksek östrojen seviyesi, hipotalamus ve hipofizin kronik negatif geri bildirimi ile sonuçlanıp gonadotropin salınım hızında ve miktarında değişikliğe sebep olmaktadır. Göreceli LH yüksekliği teka hücrelerinde androstenedion başta olmak üzere androjen yapımını artırır. Neticede daha fazla androstenedion periferel dokularda testosterona dönüşür.^{77,}

78

2.1.5.2. Egzajere Adrenarş

Polikistik over sendromu sadece peripubertal aşırı adrenarş ve fizyolojik insülin direnci beraber görülünce meydana gelir. Patolojik mekanizmanın pubertede başlaması önemlidir. Aşırı adrenarş teorisine göre PKOS'a yakalanmaya aday olan ergenler adrenarşı abartılı yaşarlar. Bu kişilerde bütün androjenik hormonların seviyesi yükselir. Yüksek adrenal androjenler periferde östrojene çevrilip hipofizin GnRH hassasiyetini artırıp luteinleştirici hormon salınmasını artırır.⁷⁹⁻⁸¹

2.1.5.3. İnsülin Direnci

İnsülin direnci, mevcut insülin miktarına karşılık azalmış glukoz cevabı olarak tanımlanır. İnsülin direnci ve artmış LH seviyesi PKOS'ta sık görülür. Polikistik over sendromlu kadınlarda, olmayanlara kıyasla daha yüksek derecede insülin direnci ve buna bağlı gelişen hiperinsülinemi görülmektedir.^{11, 79} Bu hastaların %50'sinde insülin bağlanması, insülin reseptörlerinin otofosforilasyonu ile glukoz taşınmasında aksama

olmaktadır. İnsülin, yumurtalıklarda insülin reseptörünü ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörünü aktifleştirerek gonadotropin salınmasını etkiler. Artmış insülin salınımı IGF-1 inhibe edici insülin benzeri bağlacı protein 1'i (IGFBP-1) inhibe eder ve böylece IGF-1 sentezinin artmasına neden olur. IGF-1 artışı LH seviyesini artırarak serbest testosteron salgılanmasını uyarır.^{82, 83} Yüksek doz insülin salınması karaciğerde seks hormonu bağlayıcı globülin (SHBG) seviyesini düşürür. Bu düşüş serbest testosteron seviyesini yükselterek, adrenal bezden ve overlerdeki teka hücrelerinden androjen sentezini arttırmaktadır.⁸²⁻⁸⁸

2.1.5.4. Obezite

Obezitenin sebep olduğu değişiklikler:

- Periferik aromatisasyon ile androjenlerin östrojenlere dönüşmesini artırır.
- Seks hormonu bağlayıcı globülin yapımı azalır, dolayısıyla serbest östradiol ve testosteron seviyelerini yükseltir.
- İnsülin direncine neden olarak ovaryan androjen yapımını artırır.⁴²

2.1.5.5. PKOS Genetiği

Polikistik over sendromunun oluşmasında rol oynayan genler henüz tanımlanmamış olmasına rağmen, yapılan araştırmalara göre PKOS'un otozomal dominant kalıtıldığı düşünülür ancak PKOS gelişiminde tek bir genden çok multigenik özellik rol oynamaktadır.⁸⁹

2.1.5.6. Over Patolojisi

Polikistik over sendromlu hastalarda ovulasyonun gerçekleşmemesi ve buna bağlı olarak korpus luteum oluşamamasından dolayı progesteron seviyeleri düşüktür. Düşük progesteron seviyeleri hipofiz hormonu salınım amplitüdü ve frekansının artmasına, LH salınımında artışa, FSH salınımında baskılanmaya sebep olur.⁵ Artan LH/FSH oranı yumurtalıklarda LH reseptörlerine sahip teka hücrelerinde androjen

üretimini artırırken, FSH reseptörlerine sahip granüloza hücrelerinde mitozun durmasına ve apoptoza neden olur.⁹⁰ Ayrıca, over içerisinde artan androjenler normal folikül gelişimin yavaşlamasına veya duraksamasına sebep olduğu için büyüyüp çatlaması gereken foliküller, overlerde çatlamadan milimetrik kistler halinde kalır. Bu sürecin aylık olarak tekrarlanması halinde overlerde kistlerin sayısı artar. Bu hormonal kısır döngü kronik anovulasyonun devam etmesinin temel nedenlerinden biridir.^{77, 91}

Polikistik over sendromlu overlerde foliküllerin gelişme evrelerindeki değişiklikler sebebi ile kortekste içleri folikül sıvısı ile dolu çok fazla kistik yapı mevcuttur. Overlerde kistik yapılar sebebi ile korteks hacmi genişler, tunica albugenea ise kalınlaşır.^{12, 13, 78, 92} Kistik folikül yapısının belirlenmesi biraz zordur. Çünkü kistlerin özellikleri literatürde yer alan çalışmalarda ayrı ayrı tanımlanmıştır, ancak karakteristik özellikleri her tanımlamada vardır. Kistik yapılar olgun foliküle göre çok ince bir granüloza tabakasına sahiptir ve teka tabakaları epeyce kalındır.^{13, 93} Buna ek olarak folikül sıvısı içinde makrofajlar ve doku kalıntıları bulunurken bazı kistik foliküllerin duvarlarında gelişmiş damarsal yapılar ve luteinize hücreler de görülebilir.^{12, 13, 78, 92, 94}

Polikistik over sendromlu overler elektron mikroskobu ile incelendiğinde zona pellusida kalınlığı, kaba endoplazmik retikulum ağı ve mitokondrionlar üzerine etkileri olduğu görülür. Çalışmalar PKOS'lu bireylere ait overlerin daha genişlemiş bir endoplazmik retikulumları olduğunu, dahası bu organellerde yer yer kırılmalar olduğunu ortaya çıkarmıştır.^{13, 95, 96} Polikistik over sendromunda stromal hücrelerin sitoplazmalarının genişlemesinin yanı sıra mitokondrilerde de genişleme meydana gelmekte, hasarlı ve kırık krista yapıları dikkat çekmektedir. Sık rastlanırsa da sitoplazmada yağ damlacıkları ve yapısı bozulmuş vakuoller de görülebilmektedir.⁹⁷

Polikistik over sendromunda artan LH/FSH ve androjenlerin kronik anovulasyona yol açtığı bilinmekle beraber bu süreci hangi mekanizmaların başlatığı tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu patofizyolojik sürecin başlangıcı ile ilgili öne sürülen mekanizmaların başlıcaları; hiperinsülinemiye bağlı teka hücrelerinde androjen üretiminin artışı, overlerde düşük yoğunluklu kronik inflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin artması, foliküler hücrelerde azalan ATP üretimi, foliküler hücrelerde artan apoptotik hücre ölümüdür.^{10-12, 14, 98} Bu mekanizmaların çoğunlukla granüloza ve teka hücrelerindeki mitokondrilerin işlevleri ile ilişkili olma ihtimali PKOS ile ilgili araştırmalarda mitokondriyal stresin önemini artırmıştır.

2.2. Mitokondriyon

Mitokondri tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, dinamik, semiotonom bir organeldir. Endosimbiyotik kurama göre α -probakterinin pre-ökaryotik hücrelerin içine girmesiyle oluşan bu kimerik yapı, moleküler oksijeni kullanabilir hale getirerek hücreye enerji sağlamaya başlamış ve karşılığında da korunaklı bir ortamda hazır besinlerden yararlanmış ve zaman içinde mitokondriye dönüşmüştür.^{99, 100}

Çift katlı zarı olan mitokondriler endosimbiyotik kökenli oldukları için kendilerine ait mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) sahiptirler.^{19, 101} Hücrelerdeki ATP üretiminin büyük bir bölümü burada üretildiği için hücrenin enerji merkezidirler. Buna ilaveten hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) ve demir homeostazı, redoks sinyalizasyonu, aminoasit ve lipid metabolizması, apoptoz, mitokondriyal kalıtım ve doğuştan gelen bağışıklığın düzenlenmesinde rol almaktadırlar.^{102, 103}

2.2.1. Mitokondriyonun Yapı ve Özellikleri

Mitokondriyon; mitokondriyal dış zar, zarlar arası boşluk, mitokondriyal iç zar ve matriks olmak üzere dört ana kısımdan meydana gelmektedir.¹⁹

Mitokondriyal dış zar; özelleşmiş taşıma proteinlerinden oluşur. Küçük moleküller için geçirgendir ve zarlar arası boşluk bu moleküllerin geçişine engel olmaz. Bu zarda KREBS çemberinde katalizör olan monoamin oksidaz, sitokrom-c reduktaz enzimleri, fosfolipid ve fosforik asit sentezi için gereken birçok enzim bulunur.^{104, 105}

Mitokondriyal iç zar; kendi içinde kıvrımlaşarak kristayı oluşturur ve seçici geçirgen bir yapıdadır. Elektron taşıma zinciri enzimleri ve oksidatif fosforilasyona ait enzimler burada bulunmaktadır. Bunun yanı sıra ADP ve Pi, ATP, piruvat, malat, süksinat, sitrat ve α -ketoglutarat gibi maddeler için taşıma sistemi de yine iç zarda yer almaktadır.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Matriks; jel kıvamında olup içinde erimiş çeşitli enzimler yer almaktadır. Bu enzimler, iç membranda yerleşmiş oksidatif enzimlerle işbirliği içinde besinlerin CO₂ ve H₂O'ya çevrilmesini ve sonuçta ATP'nin oluşmasını gerçekleştirir. İç zara bağlı olan matrikste trikarboksilik asit döngüsü ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunda rol oynayan enzimler yer almaktadır. Matrikste mitokondrinin kendine ait halkasal DNA'sı bulunmakta ve mitokondrinin çoğalmasında rol almaktadır.^{99, 109}

Mitokondrinin kendi genomu olmasına rağmen, neredeyse 1500 tane mitokondriyal proteinden yalnız 13'ü mtDNA tarafından kodlanmaktadır. Böylece sentezlenen bu proteinler elektron taşıma sisteminde oksidatif fosforilasyon solunum kompleksleri I, III, IV ve ATP sentazda kullanılmaktadırlar. Görevli diğer proteinler ise nükleer genom tarafından kodlanarak sitozolde sentezlenmelerini takiben 'translocase of the outer membrane' (TOM) ve 'translocase of the inner membrane' (TIM) kompleksleri ile mitokondriye taşınmaktadırlar.^{99, 110}

Mitokondride görevli öncül proteinlerde mitokondriyal giriş sinyal dizileri yer almaktadır. Bu diziler N-terminal ucunda, pozitif yüklü amfipatik α - sarmal yapıdadır ve çoğunlukla kanaldan geçtikten sonra mitokondriyal proteazlar ve peptidazlar ile

kesilmektedirler.^{111, 112} “Translocase of the outer membrane’ (TOM) kompleksi çoklu alt birime sahip olup mitokondriyal proteinlerin geçişi için reseptör ve geçiş kapısı olarak görevlidir. Mitokondriyal proteinlerin kanallardan geçebilmesi için katlanmamış olması gerekmektedir. Proteinler TOM kanallarından geçtikten sonra görev alacakları bölgeye götürülmektedirler. Dış zarın öncül proteinleri “sorting and assembly machinery” (SAM) bileşiğine yerleşir. Bu bileşik bazen TOM bileşiği ile eşleşmiş olarak görev yapmaktadır. Bazı dış zar proteinleri ise zara yerleşmek için TOM ile birlikte “mitochondrial intertase of the outhar membrane” bileşiğini kullanmaktadırlar.¹⁰⁹ Zarlar arasındaki alanda görev yapan birçok protein ise protein taşınımı ve oksidatif katlanmanın kombine olduğu “mitochondrial import and assembly” yolağı ile taşınırlar. İç zarda görevli proteinler ise iç zar translokazı TIM22 ve TIM23 komplekslerini kullanırlar. TIM22 mitokondriyal metabolitlerin ve çok geçişli transmembran proteinlerin geçişini düzenler. Matrikse protein taşınması ise TIM23 kompleksi ve “presequence translocase associated motor” ile gerçekleşmektedir.¹⁰⁹

2.2.2. Mitokondri İç Dinamikleri

Mitokondri dinamik bir organeldir ve kendi yaşamının devamlılığı, hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi farklı şartlara uyum sağlayabilmek için sürekli fisyon ve füzyon uğramaktadır. Mitokondrideki füzyon ve fisyon mitokondri bütünlüğünün korunması, mtDNA ve protein kalitesini korumak için gereklidir.^{113, 114}

Mitokondri, morfolojik plastisiteye sahip bir organeldir. Hücrenin metabolik faaliyetlerine göre yapısını değiştiren mitokondri bazen ağ yapısında bazen de tane şeklinde görülmektedir. Mitokondriyal denge ile hücre stabilizasyonu ve sağ kalımı ise küçük fragmente mitokondriyon ve uzun, birbirine bağlı mitokondriyal ağ arasındaki denge ile sağlanmaktadır.¹¹⁵

Füzyon ve fisyon arasındaki geçişler yalnız mitokondrinin işlevini sürdürmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre beslenme ve hücrenin metabolik ihtiyaçlarına cevap oluşturur. Ayrıca, füzyon ve fisyondaki farklı morfolojik durumlar fizyolojik ve fizyopatolojik şartlarla ilişkilidir.¹⁰⁹ Fragmente mitokondri (bölünmüş mitokondri, fisyon uğramış mitokondri) sıklıkla mitokondri işlevsizliği ile ilişkilidir, çünkü bu durum yüksek stres seviyeleri ve hücre ölümü sırasında ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber mitokondriyal bölünme, hücre döngüsünün G2/M fazında da görülür ve mitokondriyal hareket, kalite kontrol ve mtDNA kalıtımı için elzemdir. Kaynaşmış bir mitokondriyal ağ ise matriks bileşenlerinin dağılımına ve oksidatif fosforilasyon faaliyetinin uyarılmasına imkan sağlamaktadır.¹¹⁵

Maya ve memeliler üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar yüksek füzyon-fisyon oranına sahip hücrelerin bir kaç tane mitokondri içerdiğini ve bu mitokondrilerin uzun ve birbirleriyle ilişkili olduğunu, düşük füzyon-fisyon oranına sahip hücrelerin ise çok sayıda ve küresel ve ya kısa çubuk şeklinde mitokondrilere sahip olduğunu göstermiştir.¹¹⁶

Mitokondriyal füzyon ve fisyon dengesi, yalnız mitokondrinin zar potansiyelini değil redoks durumunu, beslenme ve toksisite yükü gibi hücre içi ve hücre dışı durumlarla da ilgilidir. Mitokondri, bu stres faktörleri ve füzyon mekanizması ile uzun ağı mitokondri oluşturarak baş eder.¹⁸ Fakat stresin süresi artar ve mitokondriyal hasar çok olursa, bu durum ölüm için sinyal oluşturur. Mitokondriyal fragmentasyon, mitokondriyal dış zar geçirgenliği ve sitoplazmaya sitokrom C salınımıyla ölüm gerçekleşir.¹¹⁷

2.2.3. Mitokondriyal Fisyon

Fragmentasyon veya fisyon mitokondrinin bölünmesi demektir. Mitokondriyal fisyon; diğer hücre yapılarının ve birçok proteinin katıldığı karmaşık bir olaydır. Bu mekanizmada görevli proteinler dynamin-ilişkili protein 1 (Drp1), mitokondriyal fisyon

protein 1 (Fis1), mitokondriyal fisyon faktörü (Mff) ve mitokondriyal dinamik proteinleridir (MiD49 ve MiD51).^{18, 118, 119} Bu olaydaki oyunculardan en önemlisi DNM1L geninin bir ürünü olan Drp1 proteinidir. Dinamin ailesine ait ve guanozin tri fosfataz (GTPaz) aktivitesine sahip olan Drp1, fisyonu katalizleyen asıl aktör olup sadece mitokondrinin değil aynı zamanda peroksizomların da fisyonuna aracılık eder.¹²⁰⁻¹²⁴

Dynamine-ilişkili protein 1, sitozolde dağılmış halde bulunur ve fosforilasyon, defosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarla aktifleşerek aktin ve mikrotübül proteinleri aracılığıyla mitokondrinin dış zarına taşınır.^{125, 126} Dynamine-ilişkili protein 1 mitokondrinin dış zarında yerini aldığı mitokondriyona bağlı, Drp1 reseptörü denilen dört tane protein ile etkileşir. Bunlar; Mid49 ve Mid51, Fis1 ve Mff'dir. Fis1, Drp1'in görevlendirilmesinde ve fisyon kompleksinin oluşumunda ana oyuncudur.^{127, 128}

Mitokondriyal bölünme esnasında Drp1, mitokondriyal dış zar üzerine yerleşir ve kesilecek bölgenin üzerinde yüzüğe benzer bir yapı oluşturarak zarın boğumlanmasını sağlar. Bu esnada GTP hidrolizi daralmayı hızlandırarak kopacak kısmı belirler.¹²⁷⁻¹²⁹

Mitokondriyal bileşenlere ilaveten endoplazmik retikulum ve aktin hücre iskeleti de mitokondriyal fisyonda görev alır. Endoplazmik retikulum ve mitokondriyon zarları arasında; kalsiyum (Ca^{+2}) taşınması, apoptotik sinyal ve lipid metabolizması gibi yakın bir ilişki vardır.^{130, 131} Bu organellerin ağlarının yakın temasları geniş ve genelde kümelenmeler halinde olan, zarlar arasında trafiğin çift yönlü olduğu yerlerdir. Endoplazmik retikulum ile mitokondriyon arasındaki temaslar mitokondriyal fisyonda da kurulmaktadır. Endoplazmik retikulum tübüllerinin yalnızca mitokondriyon ile temas kurmayıp, etrafına sarılarak mitokondriyonun daralmasına da neden olduğu

kanıtlanmıştır. Endoplazmik retikulum, tübüleri çepeçevre sararak Drp1'in mitokondriye alınmasından önce mitokondriyal tübüleri sıkılaştırır.^{130, 131}

Dynamin-ilişkili protein 1 fisyonda görev alsa da bu genin aşırı çalışması sağlıklı hücrelerde mitokondriyal yapıda ve işlevlerde anormalliklere sebep olarak ATP üretiminin inhibisyonuna ve pro-apoptotik sinyallerin aktifleşmesine neden olmaktadır.¹³²

2.2.4. Mitokondriyal Füzyon

İki veya daha fazla mitokondrinin birleşerek büyük bir mitokondri oluşturmasına mitokondriyal füzyon denir. İki bağımsız iç ve dış zarın uyum içerisinde kaynaşmasıyla meydana gelen karmaşık bir olaydır. Mitokondriyal füzyon mtDNA kaybını önleyerek azami ATP üretimini sağlar ve hatalı mitokondrilerin içeriğinin karışmasını sağlayarak yeni bir mitokondriyal içerik oluşturur.^{133, 134}

Füzyon üç farklı GTPaz tarafından katalizlenmektedir: Optik Atrofi 1 (Opa1), Mitofusin 1 (Mfn1) ve Mitofusin 2 (Mfn2)'dir. Mitokondriyal dış zarın kaynaşmasından sorumlu proteinler Mfn1 ve Mfn2'dir. Opa1 ise içteki membranın birleşmesinden sorumludur. İç ve dış zarın füzyonu esasen proteolitik yıkım ve ubiquitinasyonla olmaktadır.^{123, 135-137}

Mitofusin 2 endoplazmik retikulumda da bulunmakta ve muhtemelen endoplazmik retikulumun kontrolünde çalışarak mitokondri ile bağlantı kurulmasında görev almaktadır.¹³⁸ Mitofusin 1 ve Mitofusin 2'nin memelilerdeki görevi farelerde yapılan hedef mutasyonlarla ortaya çıkmıştır.¹¹⁵ Bunların yokluğunda mitokondriyal tübül oluşumu ve füzyon olayı gerçekleşmemektedir. Tam aksine, bu iki proteinin aşırı üretimi ise füzyon oluşumunu engellemektedir. Birbirlerinin homologue olan bu iki molekülün herhangi birinin eksikliğinde diğeri füzyon olayını meydana getirebilmektedir.¹¹⁵

Mitokondriyal füzyon üç adımda gerçekleşir;

- İki mitokondriyonun karşılıklı tutunması ,

-Zarların kenetlenmesi ve temas yüzeyinin artırılarak zarlar arası mesafenin azaltılması ve

-Mitokondri dış zarının GTP hidrolizi sonucu oluşan değişikliklerle birleşmesi.¹¹⁵

Mitokondriyal dış zar füzyonu gerçekleştiğinde mitokondriyal iç zar füzyonu da gerçekleşir. İç zarın füzyonunda Opa1 ile bazı lipid bileşenleri rol oynar. Opa1 en az iki kısmından proteolitik kesilmeyle daha kısa ve çözülebilir kırık parçaları meydana getirir.¹¹⁵

Optik Atrofi 1'in füzyondaki görevi dışında başka işlevleri de vardır. Bu görevler elektron taşıma zinciri ve zar potansiyelinin devamlılığı, mtDNA'nın devamlılığı, apoptozun denetimi ve yönetimi ile kristanın şekillenmesidir. Optik Atrofi 1, krista yapılarını değiştirerek sitokrom C üretimini sağlamaktır ve programlanmış hücre ölümünü başlatmaktadır.¹¹⁷

Mitokondriler, çeşitli stres etkenlerinin yüzünden proteinlerinin, lipidlerinin ve mtDNA'nın hasarlanmasına yatkındır ve mitokondriyal füzyon, bu hasarı azaltmak ya da yok etmek için organeller arasında mtDNA ve mitokondriyal içeriğin değişmesine imkân sağlar. Böylece mitokondriyonun sürekliliğinin sağlanmasında füzyon önemlidir. Fisyon ise işlevini kaybetmiş mitokondriyi sağlıklı mitokondriden ayırır ve hasarlı mitokondri otofaji ile ortadan kaldırılır.¹¹⁷

2.2.5. PKOS ve Mitokondriyal Stres

Son yıllarda PKOS etiyolojisinde mitokondriyal stres önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Polikistik overlerin folikülleri anormal mitokondriyal işlev, yapı ve gen ekspresyonu gösterirler. İşlevsel mitokondriyal bozuklukların, çok sayıda

hastalığın bir faktörü olarak kabul edilmesi, anormal mitokondriyal belirteçlerin PKOS ile ilişkili olduğu varsayımına yol açmıştır.^{20, 139}

Polikistik over sendromunun fizyopatolojisi ile ilgili öne sürülen mekanizmalardan biri hiperinsülinemi sonucu teka hücrelerinde meydana gelen androjen üretiminin artması, overlerde hafif kronik inflamasyon ve serbest oksijen radikallerinin artması, foliküler hücrelerde ATP üretiminin azalması ve foliküler hücrelerde artan apoptotik hücre ölümleridir. Bu mekanizmaların çoğunlukla granüloza ve teka hücrelerindeki mitokondrilerin fonksiyonlarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.^{10-12, 14, 98}

Salehi ve arkadaşları mitokondriyal dinamiklerinin düzensizliğinin hayvanlarda oluşturulmuş bir PKOS modelinde granüloza hücrelerinde otofajiye neden olduğunu kanıtlanmıştır.¹⁴⁰ Aynı zamanda mitokondriyal fisyonunda düzensizlik granüloza hücrelerinde mitofaji ve otofajik hücre ölümünü ve PKOS'ta foliküler büyüme durması ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir.¹⁴¹

Mitokondriyal gen ve fonksiyon bozukluklarının PKOS patogenezindeki rolü araştırılmış ve anormal mtDNA kopyası sayısının PKOS patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür.^{14, 139}

2.3. Sirtuinler

Mitokondriyal stres tehdidini önlemeyi amaçlayan stratejiler arayışında, sirtuinlerin olası bir rolü ortaya çıkmıştır. Sirtuinler (SIRT1-7), proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını katalize eden bir NAD⁺ bağımlı deasetilaz ya da mono-ADP-ribozil-transferaz enzimi ailesidir. Sirtuinler, tip III histon deasetilazların içinde sınıflandırılırlar ve katalitik aktiviteleri için NAD⁺ kofaktörüne ihtiyaç duymalarıyla geleneksel tip III histon deasetilazlardan işlevsel olarak farklılık gösterirler.¹⁴² Sirtuinlerin etki ettiği mekanizmaların başında gen ifadesinin düzenlenmesi gelir. Bunu

histonların deasetilasyonunu sağlayarak kromatinin yoğunlaşmasını (heterokromatin) ve böylece gen ifadesinin baskılanmasını sağlayarak yaparlar. Bununla birlikte, Sirtuinlerin (SIRT1-7) histon dışı deasetilasyon tepkimelerine katıldığı da tespit edilmiştir.¹⁴³ Sirtuinler deasetilaz tepkimelerinde, substrattan asetil grubunun koparılacak NAD⁺'ın ADP-riboz kısmına aktarımını katalizler. Tepkime, nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-riboz oluşumu ile sonuçlanır. Sirtuinler bu görevlerin haricinde metabolik zorluklara, inflamatuvar sinyallere, hipoksik ve oksidatif strese karşı hücreyi koruyucu şekilde cevap verirler.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Bunlar arasında kilit rol SIRT1 tarafından oynanır.

2.3.1. Sirtuin1 (SIRT1)

Enerji metabolizmasının bir düzenleyicisi olan Silent Information Regulator 1 (SIRT1) en çok araştırılan ve hakkında çok şey bilinen sirtuin çeşididir. Pankreas, karaciğer, kas, over, testis ve yağ dokuda bulunmuştur. Sirtuin 1'in büyük kısmı hücrenin çekirdeğinde bulunur ve ökromatinle birleşmiş haldedir, diğer bir kısmı ise sitoplazmada bulunur.¹⁴⁶

Sirtuin 1'in oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal işlevlere etkisi ile çeşitli hastalıkların gelişimine sebep olabileceği gibi, hücre yaşlanma ile de bağlantılı olabileceği gösterilmiştir.¹⁴⁵ Sirtuin 1'in etki ettiği başka bir mekanizma ise apoptoz ve hücre sağ kalımıdır. Sirtuin 1 DNA onarımı, oksidatif stres direnci ve inflamasyon gibi farklı hücre yaşlanma olayları etkileyerek hücrenin hayatta kalmasını sağlar. Metabolik homeostaz SIRT1 aracılı deasetilasyon ile kontrol edilir.¹⁴⁷

Sirtuinlerin enerji metabolizması ve mitokondriyal oksidatif savunmadaki görevleri ele alındığında SIRT1'in görevleri oldukça fazladır. Sirtuin 1 nitrik oksit (NO) üretimini, insülin/IGF-1(insulin Growth Factor-1) yolağını, FOXO (forkhead box) geni alt gruplarını düzenler ve antioksidan enzimlerin üretilmesini artırır.^{142, 144, 148, 149} Sirtuin 1, mitokondriyal gen ekspresyonu için önemli bir transkripsiyon faktörü olan PGC-1

alfa'yı (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) deasetilatlar ve aktive eder, böylece mitokondriyal biyogenezi uyarır. Diğer sirtuinlere göre SIRT1'in deasetilasyon aktivitesi daha güçlüdür.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

Sirtuin 1'in aşırı üretimi, endoplazmik retikulum stresini azaltarak ve ribozom kalite kontrolünü artırarak sitotoksik durumlara karşı hücreyi korur ve yaşamın uzamasında anahtar rol oynar.¹⁵¹ Sirtuin deasetilaz faaliyetinin esansiyel substratı olan NAD⁺ düzeylerindeki düşüş mitokondri hasarı ile bağlantılıdır. Böylece, NAD⁺ bağımlı SIRT1 faaliyetindeki düşme otofaji-lizozom işlevini aksatarak mitokondri homeostazında değişikliğe ve hasarlı mitokondri sayısının artmasına sebep olmaktadır.^{25, 145}

Nikotinamid adenin dinükleotit aracılı SIRT1 aktivasyonu fosforilasyonu baskılayarak ve defosforilasyonu hızlandırarak Drp1'in aktivasyonu ile mitokondriyal fisyonu kolaylaştırır. Sirtuin 1'in Drp1 aktivasyonunu ve dolayısıyla mitokondri parçalanmasını aktive ettiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır.¹⁵² Sirtuin 1; PGC-1 α 'nın aktivitesini arttırmak, mitokondriyal biyogenezi teşvik etmek ve mitokondriyal işlevi sürdürmek için PGC-1 α ile etkileşime girer ve PGC-1 α 'yı deasetilasyona uğratır.¹⁴⁶

2.4. Nikotinamid Mononükleotid

Nikotinamid Mononükleotid (NMN) veya Nikotinamid-1-ium-1- β -D-ribofuranoside 5'-fosfat) NAD⁺ biyosentetik yolundaki hız sınırlayıcı enzim olan nikotinamid fosforibosiltransferaz (NAMPT) tarafından B3 vitamininin bir amid şekli olan nikotinamidden ve 5'-fosforibosil-pirofosfattan sentezlenir.^{22, 153-156} Nikotinamid mononükleotit henüz diyet bileşenlerinde bulunmamıştır ve serumda varlığı tartışmalıdır. Nikotinamid mononükleotit, bir fosfat grubu ile riboz ve nikotinamid

içeren bir nükleosit arasındaki reaksiyonla doğal olarak oluşan bir biyoaktif nükleotid türüdür.^{22, 157}

İnsan hücrelerinde NMN, hücresel enerji kaynağı olarak mevcuttur. Kısa bir süre önce, bu molekül yalnızca nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) biyosentezinde bir ara ürün olarak biliniyordu.^{156, 158} Nikotinamid adenin dinükleotitin bu biyosentetik işlemi sırasında NMN, NAD^+ 'a enzimatik dönüşüme yardımcı olan nükleer kaynaklı nikotinamid mononükleotid adenililtransferaz 1 veya NMNAT1 ve mitokondriyal kökenli NMNAT3 gibi enzimler için önemli bir substrat görevi görür.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Nikotinamid adenin dinükleotitin faydalı etkilerinin SIRT1'e bağlı olduğu gösterilmiştir.¹⁶⁰⁻¹⁶³

2.5. Nikotinamid Ribozid

Nikotinamid ribozid doğal olarak sütte bulunan B3 vitamini metabolitidir. Nikotinamid ribozid nikotinamid ribozid kinazlar tarafından NMN'ye fosforile veya metabolize edilen, yakın zamanda tanımlanmış bir NAD^+ öncüsüdür.^{27, 142} Nikotinamid ribozid takviyesi, mayada ve farelerde yaşam süresini uzatır ve farelerde yüksek yağlı diyetle bağlı metabolik komplikasyonları iyileştirir. Nikotinamid ribozidin son zamanlarda farelerde NAD^+ için tercih edilen, oral yoldan temin edilebilen hepatik prekürsör olduğu ve tek oral dozlarda insan NAD^+ metabolizmasını güvenli bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir.^{28, 164-167}

Nikotinamid ribozidin NAD^+ 'ya dönüşümü, NR kinazlar tarafından NR'nin NMN'ye fosforilasyonu ile başlatılır. Nikotinamid ribozid, NAD^+ sentezini ve sirtuin aktivitesini artırır.^{23, 27, 164, 165} Nikotinamid ribozid mitokondriyal olarak tercih edilen bir NAD^+ öncüsüdür ve NR'nin in vivo aktiviteleri, mitokondriyal sirtuin aktivitelerine bağlı olarak yorumlanmıştır. Nikotinamid ribozid, sirtuini aktifleştirir ve performansını

artırır.^{26, 28} Nikotinamid ribozidin bir dizi çalışmada mitokondriyal sağlığı önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir.^{26, 165}



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Etik Kurul Onayı

“Nikotinamid mononükleotid (NMN) ve nikotiamid ribozid (NR) ile mitokondriyal stres inhibisyonunun dehidroepiandrosteron (DHEA) ile indüklenmiş polikistik over sendromlu ratlarda anovulasyon üzerine etkilerinin araştırılması” adlı bu çalışmanın, etik kurallara uygunluğu, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 01.04.2019 tarihli 4. toplantısının 81 nolu kararı ile belirlenmiştir.

3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Araştırmada, Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden alınan, ağırlıkları 58-92 gram aralığında olan 21 günlük 20 adet dişi Sprague Dawley ırkı sıçanlar kullanıldı. Deney bitimine kadar hayvanlara yeterli içme suyu ve standart sıçan yemi verildi, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ve 22°C ortam sıcaklığı ile %45-50 nem oranı olan laboratuvar ortamında olağan yaşamları devam ettirildi.

3.3. Deney Grupları

Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden alınan 20 adet sıçan, her grupta 5 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Gruplar şöyle oluşturuldu;

Grup 1: Kontrol

Grup 2: PKOS

Grup 3: PKOS + NMN

Grup 4: PKOS + NR

3.4. Polikistik Over Modeli

Sıçanların ağırlıkları PKOS modeli oluşturulmadan önce ölçüldü. Kontrol grubu dışındaki gruplara 20 gün süresince Dehidroepiandrosteron (6mg/100 gr vücut ağırlığı/0.2 cc susam yağı) deri altı enjeksiyonu ile verildi. Dehidroepiandrosteron

verildikten sonra 10. gün, 20. gün, 30. gün ve deney bitiminde sıçanlar tekrar tartıldı. 21. günden itibaren, PKOS modelinin oluşup oluşmadığını tespit etmek için hayvanlardan günlük vajinal smear alındı, östrus döngüleri takip edildi ve düzensiz döngüsü olanlar PKOS modeli pozitif olarak değerlendirildi.

3.5. İlaç Uygulama Prosedürü

Kontrol grubuna 0.2 ml susam yağı subkutan şeklinde 20 gün boyunca yapıldı. PKOS modeli oluşturulan 3. gruba 17 gün boyunca PBS’de eritilmiş 500 mg/kg NMN intraperitoneal olarak, 4. gruba 7 gün boyunca NR 200 mg/kg dozunda oral olarak uygulandı.

3.6. Sıçanlarda Vajinal Smear Değerlendirilmesi

Pamuklu çubuk ile vajinal smear alındıktan sonra lam üzerine yayma yapıp kurutuldu. %70’lik etanol ile tespitlenen vajinal yayma örnekleri 10 dakika hematoxilen ile boyanarak distile sudan geçirilip entellan ile kapatıldı. Ardından Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobu ile kornifiye hücrelerin, epitel hücrelerin, lökositlerin ve mukusun varlığı incelenip hayvanların östrus döngüsü değerlendirildi.

3.7. Deneyin Sonlandırılması

İlaç uygulamaları bittikten sonra (38. Günde) ötenazi edildi. Her sıçanın kan örneği alındı, sağ overleri histopatolojik incelemeler için %10 formalin içerisinde konuldu, sol overleri ise moleküler incelemeler için -80°C buzdolabında saklandı.

3.8. FSH ve LH ELISA Ölçüm Basamakları

Folikül uyarıcı hormon ve luteinleştirici hormon ölçümü, sıçanlara özel ELISA kitinin (Elabscience, 96 kuyu, FSH kit Cat. No: E-EL-R0391 ve LH kit Cat. No: E-EL-R0026) protokolüne göre yapıldı. Her bir sıçana ait 100 µL serum örneği ve standart, kitin içerisinde bulunan 96-kuyucuklu hazır plaka içerisinde bulunan bir adet kuyucuğa konuldu ve 37°C ’de 90 dakika inkübe edildi. Kuyucuklara konulan serumlar kit

protokolüne göre işleme tabi tutuldu. Buna göre her kuyuya 100µL Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Plaka aspire edildi ve 3 kez yıkandı. 100µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Plaka aspire edilip ve 5 kez yıkandı. 90µL Substrat Reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. 50µL durdurma solüsyonu eklendi. Sonra her bir kuyucuğun absorbansı 450 nm'de ölçüldü. Kit protokolüne göre standart grafik hazırlanarak her bir serum örneğinde bulunan FSH konsantrasyonu ng/ml ve LH konsantrasyonu mIU/ml olarak hesaplandı. Sonuçlar IU/L'ye çevrildi.

3.9. Leica TP 1050 Doku Takibi Cihazı Basamakları

Doku takibi yarı otomatik cihazda (Leica TP 1050, Çin) yapıldı. Cihazın çalışma basamakları:

- Distile su ile yıkama
- %10'luk tamponlanmış formalin (1 h 15 dk)
- %70'lik alkol (1 h), % 80'lik alkol (1 h)
- % 90'lık alkol (1 h)
- Saf alkol (1 h)
- Saf alkol (1 h 15 dk)
- Ksilol (1 h)
- Ksilol (1 h)
- Ksilol (1 h 20 dk)
- Parafin (1 h)
- Parafin (1 h)
- Parafin (1 h 30 dk)

Cihaz formalin, alkol ve ksilen aşamalarında 40 °C'de, parafin aşamasında ise 65 °C'de çalışmaktadır. Takibin ardından dokular, manuel olarak erimiş parafin ile bloklanıp +4

⁰C soğutuldu, Leica RM 2145 mikrotom ile beşer mikron kalınlığında altışar kesit alındı. Bu 6 kesitin 3 tanesi normal lama hematoksilen eozin boyama için, 3 tanesi de pozitif şarjlı lamlara immünohistokimyasal işlemler için alındı.

3.10. Hematoksilen ve Eozin Boyama Prosedürü

Dokular etüvde 60 dakika boyunca deparafinize edildi. Etüvden alınan dokular aşağıdaki aşamalardan geçirildi:

- Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
- Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
- %100 Etil alkol 10 dakika
- %96 Etil alkol 10 dakika
- %80 Etil alkol 10 dakika
- %70 Etil alkol 10 dakika
- Distile suya batırıp çıkarma
- Hematoksilen 3 dakika
- Akarsu yıkanma
- Asit -alkole batırıp çıkarma
- Amonyak 1-2 saniye
- Musluk suyunda yıkama
- Eozin 10 saniye
- %70 Etil alkol 10 dakika
- %80 Etil alkol 10 dakika
- %96 Etil alkol 10 dakika
- %100 Etil alkol 10 dakika
- Xylen 10 dakika
- Kapatma; Xylen den alınan lamlar üzerine entellan yapıştırma balzamu

damlatıldı. Hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatıldı.

3.11. Folikül Sayımı Yöntemi

Sıçanların overlerinin ortasından alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyandıktan sonra antral folikül ve kistik yapıların kıyaslaması yapıldı. Over foliküllerinin sınıflandırılması Üzümcü ve arkadaşlarının yaptığı sınıflamaya göre gerçekleştirildi.¹⁶⁸

Tablo 3.1. Over foliküllerinin sınıflandırılması

Folikül	Primordiyal folikül	Primer folikül	Sekonder folikül	Preantral folikül	Antral folikül
Oosit	Primer oosit	Primer oosit	Primer oosit	Primer oosit	Primer oosit
Oositi çevreleyen folikül epitel hücreler	Tek katlı yassı pregranuloza hücreleri ve en fazla bir tane kübik granuloza hücresi içerenler	Tek katlı iki ya da daha fazla kübik granuloza hücreler	İki ya da üç katlı kübik granuloza hücreleri	Üç katın daha fazla granuloza hücreleri, antrum şekillenmemiş ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıklar oluşmuş	Çok katlı granuloza hücreleri ve antrum şekillenmiş granuloza hücreleri

3.12. Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

3.12.1. Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Sıçan over dokularından cDNA kütüphanesi hazırlamak için mRNA izolasyonu Total RNA İzolasyon Kiti (Roche, Germany) protokolüne göre yapıldı. Doku örnekleri yeterli miktarda 1.5 ml ependorf tüplere alındıktan sonra her bir tüpe kit içerisinde bulunan parçalama çözeltisi eklendi. Çözelti içerisinde dokular homojenizatör ile buz içerisinde homojenize edildikten sonra kit protokolüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon süresi boyunca işlemler buzda yapıldı. RNA'lar cDNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.12.2. Total RNA'nın Spektroskopik Olarak Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Saflığının Kontrolü

RNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için Thermo Cihazı kullanıldı. Cihaz tarafından verilen 260/280 saflık oranları ve konsantrasyon değerleri göz önünde bulundurularak cDNA sentezine geçildi.

3.12.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA sentezi cDNA Sentez Kiti (Applied Biosystems, USA) protokolüne göre yapıldı. RNA örneklerinden 10'ar µl PCR tüplerine alındı. Kit protokolüne göre her bir RNA örneği için reaksiyon kuruldu. Tüm işlemler buzda yapıldı. Termal döngülü PCR cihazında RNA örnekleri komplementer DNA'ya çevrildi.

3.12.3. Eş Zamanlı Quantitatif PCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonlarının Analizi

Sentezlenen cDNA örnekleri kullanılarak her bir örneğin Drp1, Mfn1 ve Mfn2 rat genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Kontrol geni olarak β -aktin geni kullanıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri her bir genin Taqman Prob kiti (Applied Biosystem, USA) protokolüne göre ölçüldü. Kit protokolüne göre PCR tüplerinde her bir örneğin dört gen için reaksiyonları üç tekrarlı olarak hazırlandı. Bir tüpe kontaminasyon olup olmadığını anlamak için komplementer DNA haricinde sadece diğer reaksiyon bileşenleri konularak negatif kontrol grubu oluşturuldu. Tüm işlemler buzda yapıldı. RT-QPCR cihazında (Biorad, USA) her bir örnek için belirtilen genlerin komplementer DNA halleri çoğaltıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri literatürde belirtildiği gibi β -aktin ekspresyonu baz alınarak hesaplandı.¹⁶⁹

Tablo 3.2. Genlerin ileri ve geri primer sekansları

Drp1	İleri primer	5'-CGTAGTGGGAACTCAGAGCA-3'
	Geri primer	5'-TGGACCAGCTGCAGAATAAG-3'
Mfn1	İleri primer	5'-CCTTGTACATCGATTCCTGGGTTC-3'
	Geri primer	5'-CCTTGTACATCGATTCCTGGGTTC-3'
Mfn2	İleri primer	5'- GATGTCACCACGGAGCTGGA-3'
	Geri primer	5'- AGAGACGCTCACTCACTTTG-3'
β -aktin	İleri primer	5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'
	Geri primer	5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'

3.13. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Over dokularından 2 μ m kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon basamağından sonra IHC/ISH cihazı kullanılarak (Bond Max, Leica Biosystems, Avustralya) Mfn1 primer antikoru (200 μ g/ml, 1:50, SC166644, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Amerika Birleşik Devletleri), Mfn2 primer antikoru (200 μ g/ml, 1:50, SC515647, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Amerika Birleşik Devletleri), Drp1 (200 μ g/ml, 1:50, SC271583, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Amerika Birleşik Devletleri), ve bunlara uygun sekonder antikorlar ile inkübe edildi. Her over kesitinde 20 farklı alan iki histolog tarafından değerlendirildi.

Tablo 3.3. İmmünohistokimya boyama prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 derecelik etüvde	60 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük etanol	5 dakika
Rehidratasyon	%96'lık etanol	5 dakika
Rehidratasyon	%90'lık etanol	5 dakika
Rehidratasyon	%80'lik etanol	5 dakika
Rehidratasyon	%70'lük etanol	5 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Endojen enzim blokajı	Hidrojen peroksit blok	10 dakika
Yıkama	PBS'de 2 kez	
Blokaj	Protein blok	10 dakika
Yıkama	PBS	15 saniye
Antikor	Primer antikor	1 saat
Yıkama	PBS'de 4 kez	
Boyama	Biotilylated Goat anti- polyvalent	10 dakika
Yıkama	PBS'de 4 kez	
Boyama	Steptavidin Peroxidase	10 dakika
Yıkama	PBS'de 4 kez	
Boyama	DAB	5-10 dakika
Yıkama	PBS'de 4 kez	
Boyama	Harris hematoksilen	3 dakika
Yıkama	Musluk suyu	
Dehidratasyon	%70'lik etanol	5 dakika

Tablo 3.3. (Devam)

Dehidratasyon	%80'lik etanol	5 dakika
Dehidratasyon	%90'lık etanol	5 dakika
Dehidratasyon	%100'lük etanol	5 dakika
Dehidratasyon	%100'lük etanol	
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 3.4. İmmünopozitivite skorlaması

Skor	
0	% 0
1	% 0-30
2	% 30-60
3	% 60-100

3.14. İstatiksel Analizler

IBM 20.00 SPSS paket programıyla verilerin istatiksel olarak analizi yapıldı. Deneklere ait verilerin normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile test edildi. Grupların karşılaştırılmasında kilo artışları, antral folikül sayısı, elisa sonuçları, RT-PCR sonuçları normal dağılıma uyduğu için tek yönlü varyans analizi One Way Anova çoklu karşılaştırma testinden LSD testi ile değerlendirildi ve $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

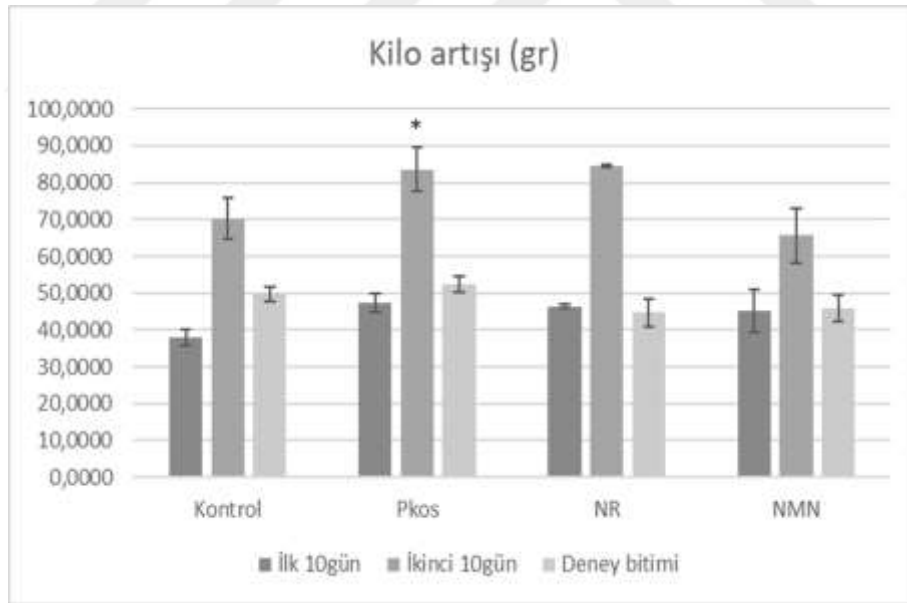
İmmünohistokimyasal değerlendirmede yarı kantitatif skrolama kullanıldı. Her bir overden en az 5 farklı alanın boyanma yoğunluğu göz önünde bulundurularak skorlandı. Bu değerlendirmede immün pozitif ve immün negatif boyama skorlamaları; çok az ya da yok ise 0 (% 0), hafif ise 1 (% 0-30), orta ise 2 (% 30-60), yoğun ise 3 (% 60-100) şeklinde belirlendi.¹⁷⁰ Parametrik olmayan bu immünopozitivite verileri Kruskal Wallis ve Tamhane T2 testi ile değerlendirildi. $P<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.¹⁷¹



4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

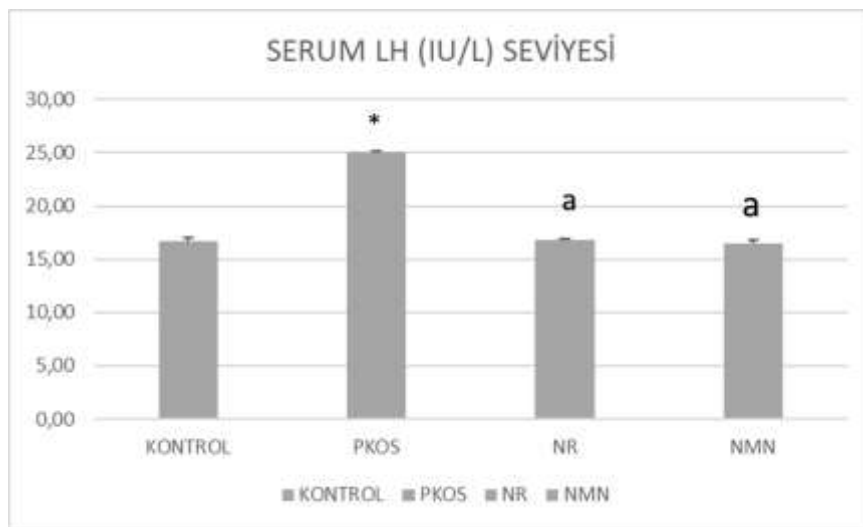
Çalışmamızda, PKOS'a bağlı olarak, kilo artışını değerlendirmede kullandığımız ölçütlerden biri ağırlıktır. Bu nedenle, sıçanların ağırlıkları deneyin başlangıcında ve deney boyunca 10 günde bir ölçüldü. Büyüme çağında olmaları nedeniyle tüm deneklerde, deney sonu vücut ağırlıklarında artış gözlemlendi. Bununla beraber, PKOS grubunda ve tedavi gruplarında bulunan sıçanların birçoğunda, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen ($p>0.05$) kilo alma oranlarının yüksek olması sebebiyle, son tartım ile ilk ağırlık tartımı arasındaki fark, kontrol grubuna oranla daha yüksek tespit edildi. Ayrıca ikinci on gündeki PKOS ile NMN grubu arasındaki ağırlık artışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p<0.05$) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Deneyin başlangıcından itibaren kontrol, PKOS, NR ve NMN gruplarına ait 10'ar günlük kilo artışı grafiği. (Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edildi. * $p<0.05$ vs NMN)

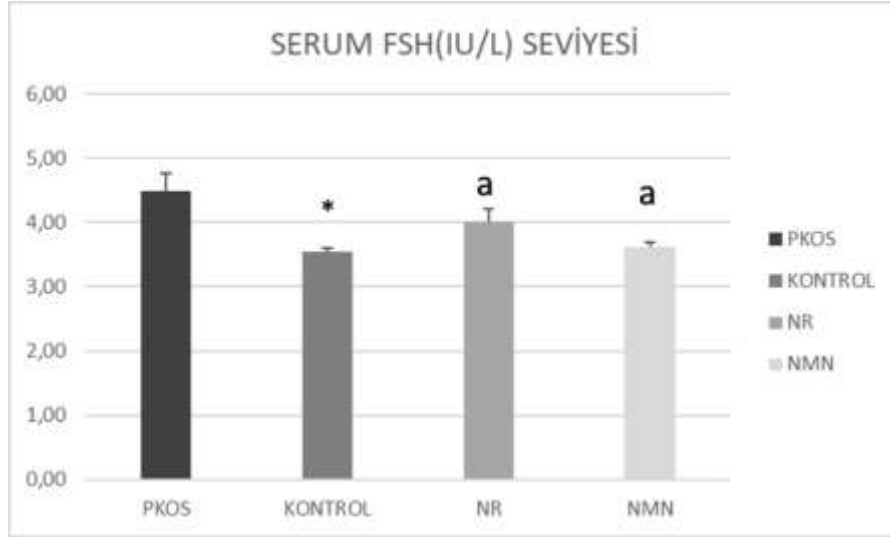
4.2. Serum FSH ve LH Bulguları

Grupların karşılaştırılması sonucunda kontrol grubu ile PKOS grubu LH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenirken ($p<0.001$), tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). Kontrol grubuna göre PKOS grubunda LH hormonu seviyesinin önemli derecede arttığı tespit edildi (Şekil 4.2.). Serum FSH hormonlarının biyokimyasal sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile PKOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenirken ($p<0.02$), tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$), (Şekil 4.3.). Kontrol grubu LH/FSH oranı ile PKOS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenirken ($p<0.003$), tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). LH/FSH oranındaki en yüksek seviye PKOS grubunda görülmüştür. Nikotinamid ribozid ve nikotinamid mononükleotit gruplarındaki LH/FSH değerlerini PKOS grubuyla karşılaştırdığımızda anlamlı bir azalma olduğu, değerlerin kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görüldü (Şekil 4.4.).

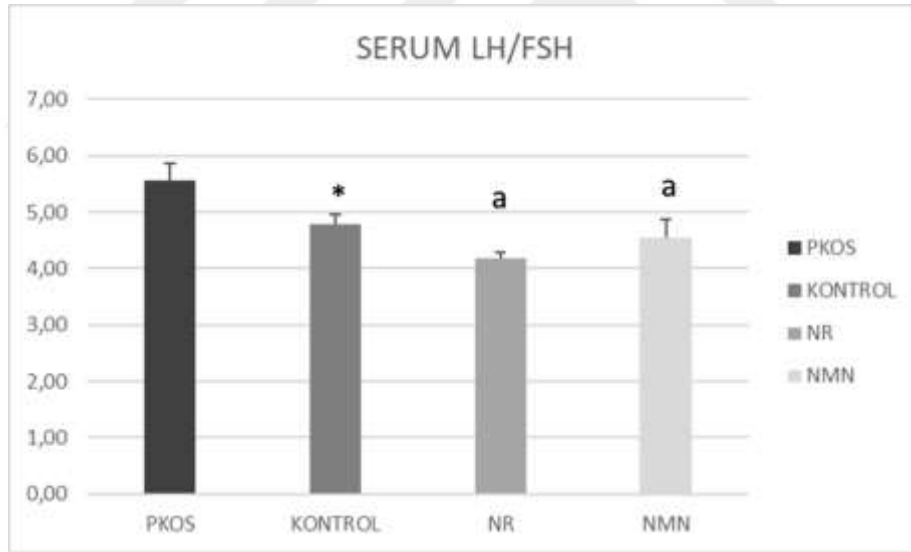


Şekil 4.2. Gruplara ait serum LH seviyesi. (Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edildi.

* $p<0.001$ vs kontrol, a $p<0.01$ vs PKOS).



Şekil 4.3. Gruplara ait serum FSH seviyelerindeki değişimleri gösteren grafik. (Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edildi. * $p < 0.02$ vs PKOS, a $p < 0.05$ vs PKOS).

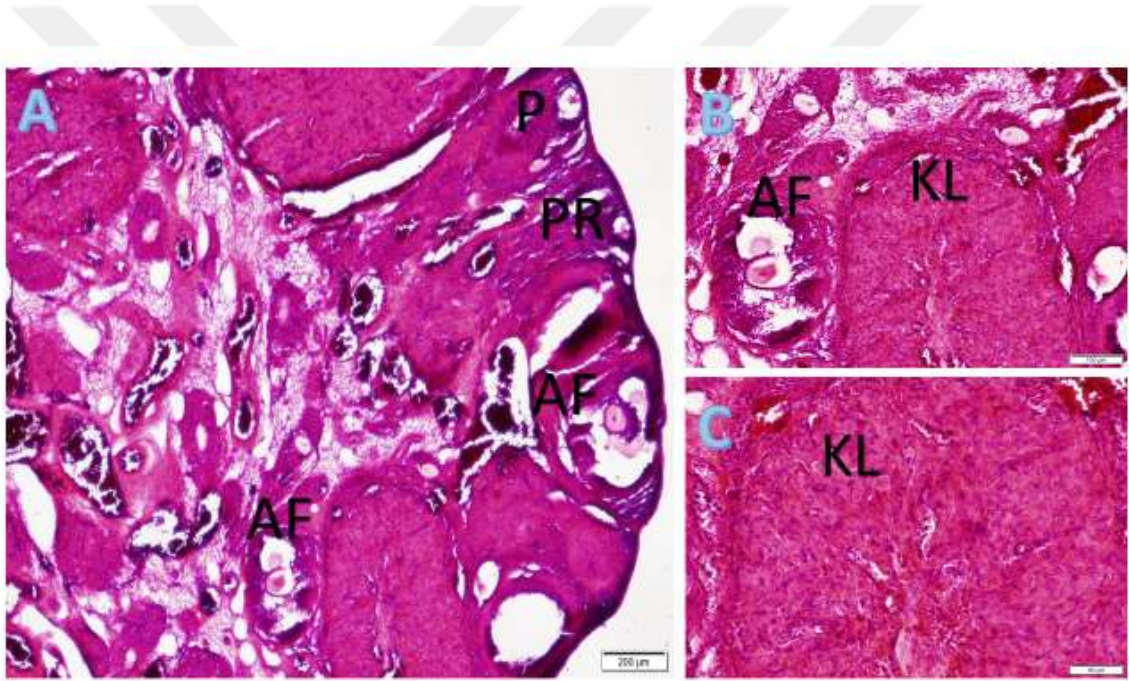


Şekil 4.4. Gruplara ait LH/FSH oranlarını gösteren grafik. (Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edildi. * $p < 0.003$ vs PKOS, a $p < 0.05$ vs PKOS).

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen ve Eozin Boyama Bulguları

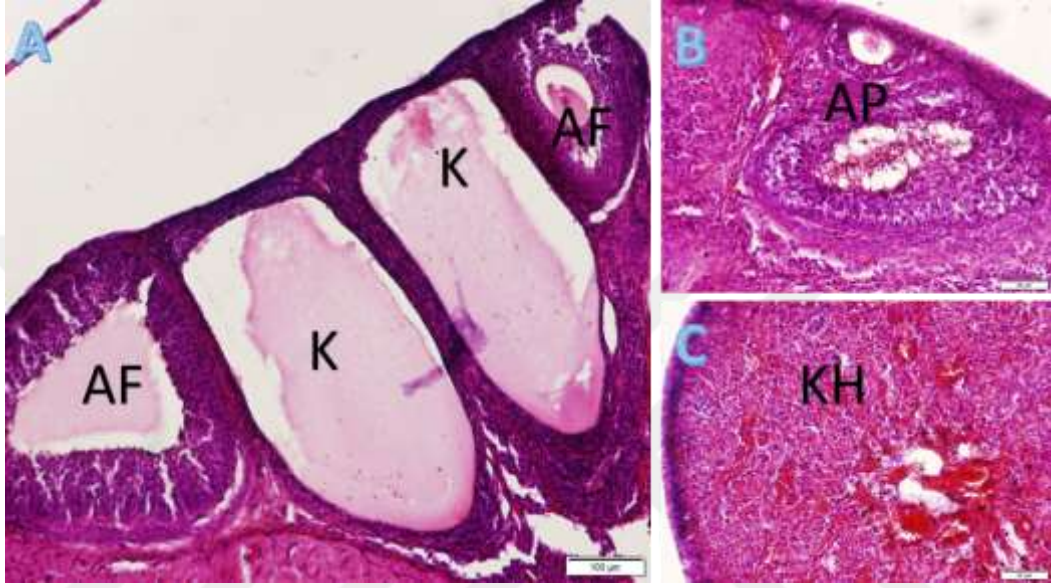
Kontrol grubuna ait over kesitleri incelendiğinde normal görünümde oldukları tespit edildi. Dışta korteks içte medulla sağlıklı olarak gözlendi. Overin dışını saran, tek katlı kübik epitelden müteşekkil germinal epitel ve hemen altındaki düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea olağan görünümde izlendi. Tunika albugineanın hemen altında primordiyal foliküller normal olarak görüldü. Farklı gelişim evrelerindeki folikül yapıları ve korpus luteumlar olağan seyrinde görüldü (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kontrol grubna ait H-E kesitler. Bu grupta over dokusunda oositlerin çeşitli aşamalardaki foliküller izlenmekte. P; Primer folikül, PR; Primordial folikül, AF; Antral folikül, KL; Korpus Luteum. Hematoksilen-Eozin Boyama, A(x10)-B(x20)-C(x40).

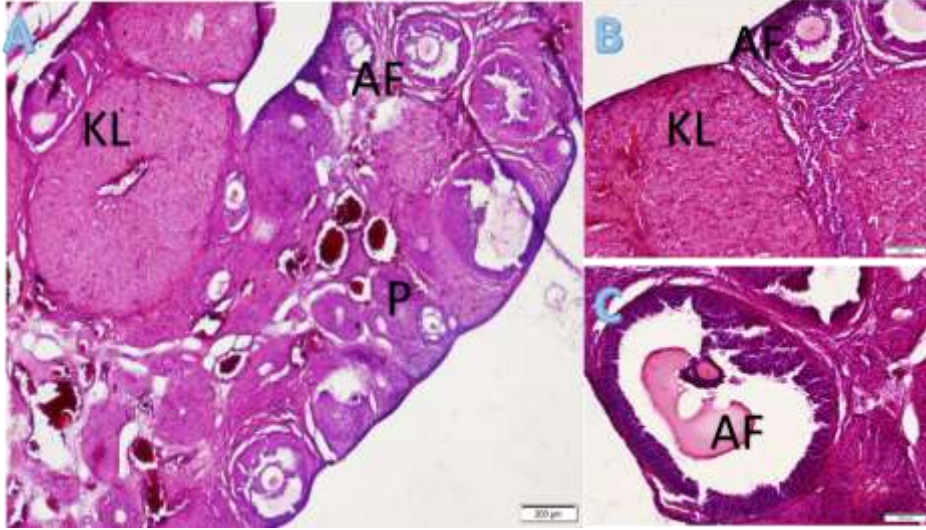
Polikistik over sendromlu sıçanlara ait kesitlerde çok sayıda kistik yapılar saptandı. Medullada bağ dokunun azaldığı görüldü. Antral folikül sayısında ciddi bir azalma görze çarptı (Şekil 4.9.). Az sayıdaki antral foliküllerde birkaç tane sağlam oosit görüldü. Korpus hemorajikum bol eozinofilik sitoplazmalı, tek tip yuvarlak hücreler

içeriyordu. Ovulasyonun bir göstergesi olan korpus luteum sayısı ise kontrol grubuna göre azdı ve hacimsel olarak büyük olarak gözlemlendi. Foliküllerde incelmış granüler tabaka ve kalın teka hücre tabakası mevcuttu. Luteinize olmuş teka hücreleri görüldü. Hemorajik alanlar, apoptotik hücreler de izlendi (Şekil 4.6.).



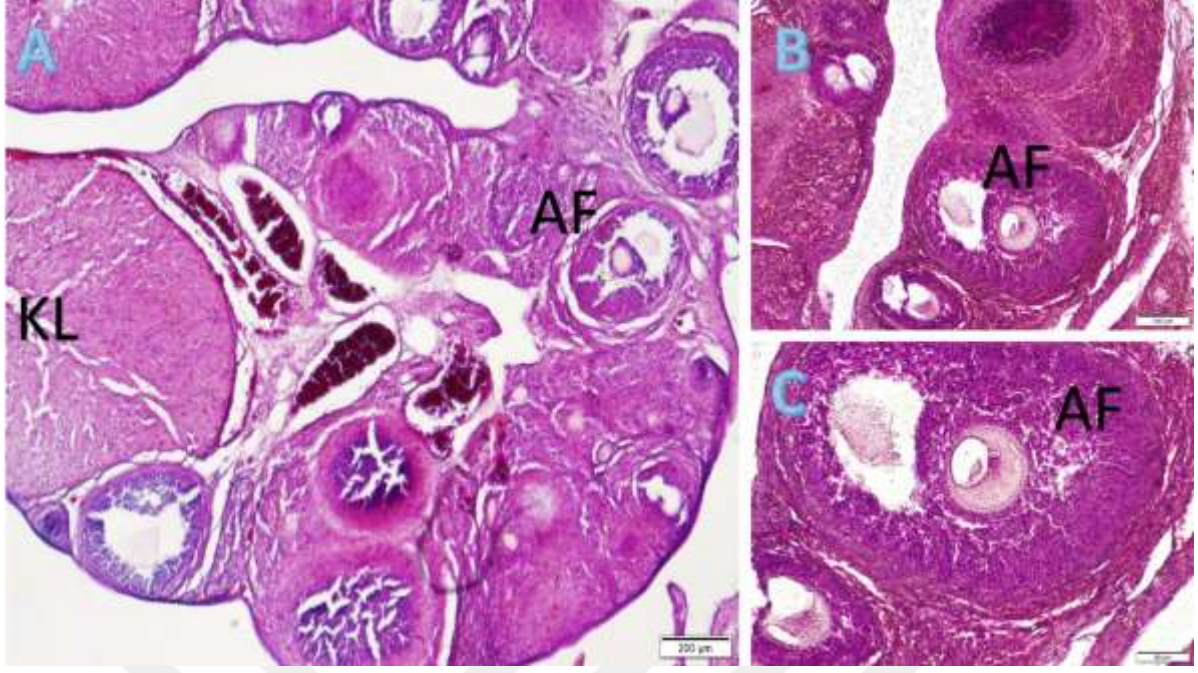
Şekil 4.6. PKOS grubu H-E kesitleri. Bu grupta over dokusunda kistler, atreziye uğrayan antral foliküller ve eritrosit infiltrasyonu gösteren korpus luteum izlenmekte. K; Kist, AF; Antral folikül, AP; apoptoza giden antral folikül, KH; Korpus Hemorajikum. Hematoksilen-Eozin Boyama, A(x10)-B(x20)-C(x40).

Nikotinamid ribozid grubuna ait sıçanların over dokularında kistik yapılar çok nadir bulundu. Polikistik over sendromu grubuna göre antral folikül sayısında ciddi bir artış saptandı (Şekil 4.9.). Foliküller kontrol grubunda olduğu gibi farklı gelişim evrelerinde görüldü. Korpus luteum sayısındaki artış da PKOS grubuna göre oldukça göze çarpan bulgulardan biridir. Kan damarlarının daha düzgün çeperli olduğu görüldü. Folikül çevresindeki granüloza ve teka hücreleri oldukça sağlıklı görüldü. Medullada bağ doku alanları kontrol grubuna göre az, PKOS grubuna göre fazla olarak izlendi. Korpus luteum sayısı PKOS grubuna göre arttı (Şekil 4.7.).

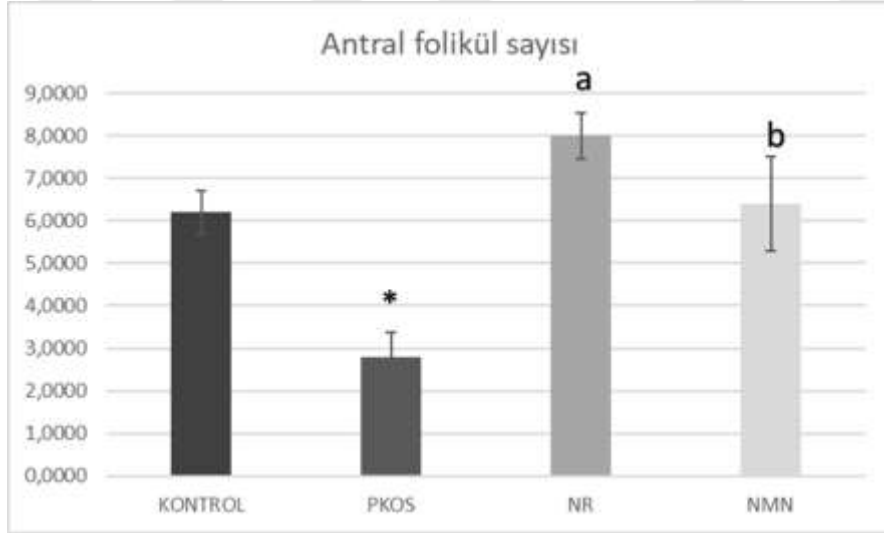


Şekil 4.7. NR grubu H-E kesitleri. Bu grupta over dokusunda çeşitli gelişim aşamalarındaki sağlıklı foliküller izlenmekte. P; Primer Folikül, AF; Antral folikül, KL; Korpus Luteum. Folikül Hematoksilen-Eozin Boyama, A(x10)-B(x20)-C(x40).

Nikotinamid mononükleotit grubuna ait over kesitlerinde folikül gelişimi normal olarak izlendi ve kistlerin çok az sayıda ve küçük bir yapıda olmaları dikkat çekicidir. Şekil 4.9.'da da görüldüğü gibi antral folikül sayısındaki artış da dikkati çeken bir başka bulguydu. Foliküllerin aktifliğinin bir göstergesi olan korpus luteum sayısında PKOS grubuna göre bir artış olmasıyla birlikte korpus luteumlarda eritrosit mevcudiyeti az da olsa tespit edildi. Kan damarları belirgin sınırlara sahipti. Medullada bağ doku hacimsel olarak kontrol grubu kadar olmasa da yeterli hacimde sayılabilirdi. (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. NMN grubu H-E kesitleri. Bu grupta over dokusunda çeşitli gelişim aşamalarındaki sağlıklı foliküller izlenmekte. AF; Antral folikül, KL; Korpus Luteum. Hematoksilen-Eozin Boyama, A(x10)-B(x20)-C(x40).



Şekil 4.9. Gruplara ait antral folikül sayısını gösteren grafik. (Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. * $p < 0.003$ vs kontrol, a < 0.05 vs PKOS, b < 0.05 vs PKOS).

4.3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Mitofusin 1 immünreaksiyonu, kontrol grubu overlerinin yüzeyindeki tüm folikül sınıflarında gözlendi. İmmünreaksiyon başlıca granuloza hücrelerinde, oositte, intersitisyel hücrelerde ve bazı folliküllerin teka hücrelerinde sitoplazmik boyanma şeklinde belirlendi. Kontrol grubuna ait over kesitlerinde foliküllerdeki granuloza hücrelerinin Mfn1 pozitivitesi yoğun olarak izlendi (Mfn1 pozitivite skoru: 2(2-2)). Polikistik over sendromu grubuna ait over kesitlerinde immün reaksiyon şiddeti daha zayıf olarak izlendi. Foliküllerin granuloza hücrelerinde Mfn1 pozitivitesinin azaldığı, mevcut pozitifliğin ise folikülün içine yakın granuloza hücrelerinde olduğu izlendi (Mfn1 pozitivite skoru: 1(1-1)). Nikotinamid mononükleotit tedavi grubunda pimordial, primer, sekonder ve antral foliküllerde granuloza hücrelerinde aynı zamanda oositlerde Mfn1'in eksprese olduğu izlendi ve orta derecede Mfn1 pozitivitesi skorlandı (Mfn1 pozitivite skoru: 2(1-2)). Nikotinamid ribozid tedavi grubuna ait over dokusunda preantral foliküllerde granuloza hücrelerinde diğer folikül sınıflarına göre Mfn1 reaksiyonunun arttığı ve bu kesitlerde orta derecede pozitiflik olduğu gözlendi (Mfn-1 pozitivite skoru: 2(1.5-2)) (Tablo 4.1.) (Şekil 4.10.).

Tablo 4.1. Grupların immünopozitivite Skorlama Sonucu (medyan-(%25-%75 interquartile range)).

Grup	Mfn1	Mfn2	DRP1
	Pozitivite	Pozitivite	Pozitivite
	Skoru	Skoru	Skoru
Kontrol	2(2-2)	2(1.5-2)	0(0-1)
PKOS	1(1-1) ^a	2(1-2)	3(3-3) ^a
NMN	2(1-2) ^b	2(1.5-2)	2(1-2) ^{a,d}
NR	2(1.5-2) ^c	2(1-2)	2(1-2) ^{a,d}

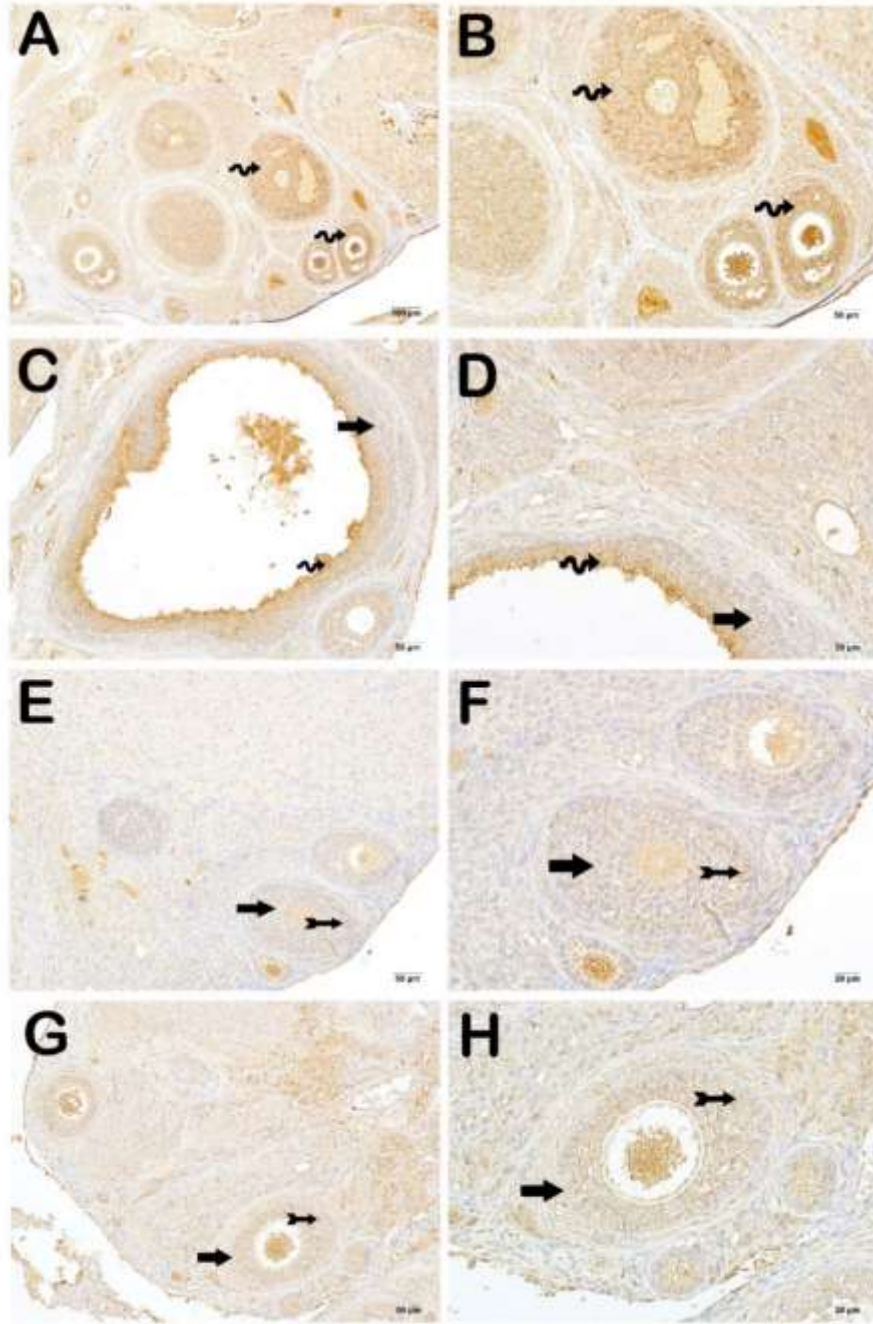
^a $p=0.000$; Kontrol grubuna kıyasla,

^b $p=0.006$; PKOS grubuna kıyasla,

^c $p=0.002$; PKOS grubuna kıyasla,

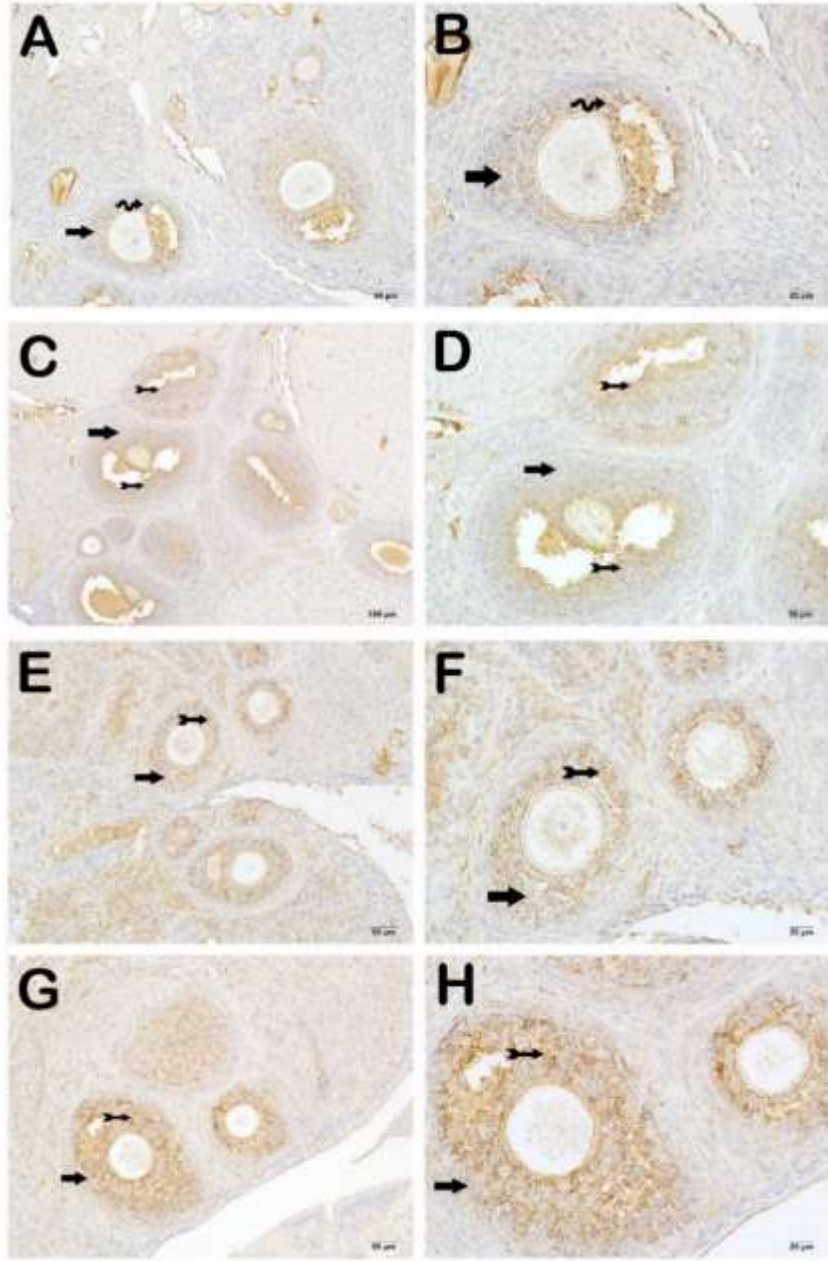
^d $p=0.000$; PKOS grubuna kıyasla,

Kruskal Wallis/Tamhane T2 Testi



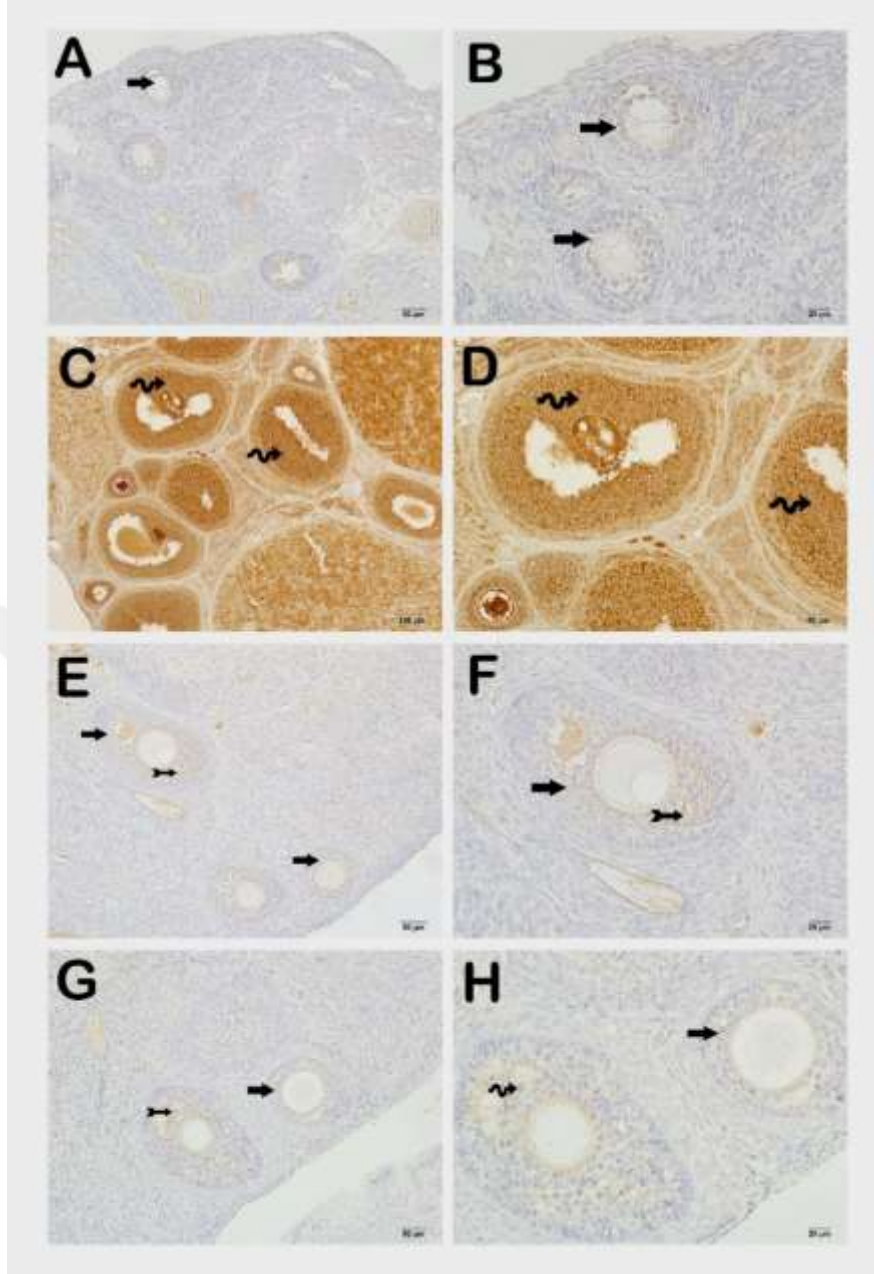
Şekil 4.10. Mfn1 primer antikoruna ile inkube edilmiş over dokusuna ait kesitler. **A(x10)-B(x20):** Kontrol grubuna ait over kesitleri, folikül hücrelerinde yoğun pozitiflik (kıvrımlı oklar), **C(x20)-D(x40):** PKOS grubuna ait over kesitleri, folikül lümenine bakan hücrelerde Mfn1 ekspresyonu (kıvrımlı oklar), lümenine bakmayan hücrelerde az yoğun pozitiflik (kalın ok) **E(x20)-F(x40):** NMN tedavi grubuna ait over kesitleri, granüloza hücrelerinde (kalın ok) ve teka hücrelerinde (kuyruklu ok) Mfn1 ekspresyonu, **G(x20)-H(x40):** NR tedavi grubuna ait ovarium kesitleri, granüloza hücrelerinde (kalın ok) ve teka hücrelerinde (kuyruklu ok) Mfn1 ekspresyonu,

Over dokularındaki Mfn2 dağılımı immünohistokimyasal olarak incelendiğinde tüm gruplarda Mfn2'nin varlığı genellikle granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında tespit edildi. Mitofusin 2 primer antikoru ile inkübe edilmiş kontrol grubuna ait over kesitlerinde foliküllerdeki granüloza hücrelerinde orta düzeyde Mfn2 pozitivitesi gözlemlendi (Mfn2 pozitive skoru: 2(2-2)). Polikistik over sendromu grubuna ait over kesitlerinde foliküllerde, özellikle lümene bakan granüloza hücrelerinde az yoğun Mfn2 pozitivitesi görüldü (Mfn2 pozitive skoru: 2(1-2)). Nikotinamid mononükleotit tedavi grubuna preantral folikülleri granüloza hücrelerinde orta derecede Mfn2 pozitivitesi izlendi (Mfn2 pozitive skoru: 2(1-2)). Nikotinamid ribozid tedavi grubuna ait over dokusunda preantral foliküllerde granüloza hücrelerinde orta derecede Mfn2 pozitivitesi gözlemlendi (Mfn2 pozitive skoru: 2(1.5-2)) (Şekil 4.11.) (Tablo 4.1.).



Şekil 4.11. Mfn2 primer antikoru ile inkube edilmiş over dokusuna ait temsili ışık mikroskopik ekran görüntüsü. A(x10)-B(x20): Kontrol grubuna ait over kesitleri, orta düzeyde Mfn2 ekspresyonu (kalın ok ve kıvrımlı ok) C(x10)-D(x20): PKOS grubuna ait over kesitleri az yoğun Mfn2 ekspresyonu (kalın ok), folikül lümenine bakan hücrelerde nispeten fazla pozitiflik (kuyruklu ok). E(x20)-F(x40): NMN tedavi grubuna ait over kesitleri, orta şiddette Mfn2 ekspresyonu (kuyruklu ok ve kalın ok) G(x20)-H(x40): NR tedavi grubuna ait over kesitleri, orta şiddette Mfn2 ekspresyonu (kalın ok ve kuyruklu ok).

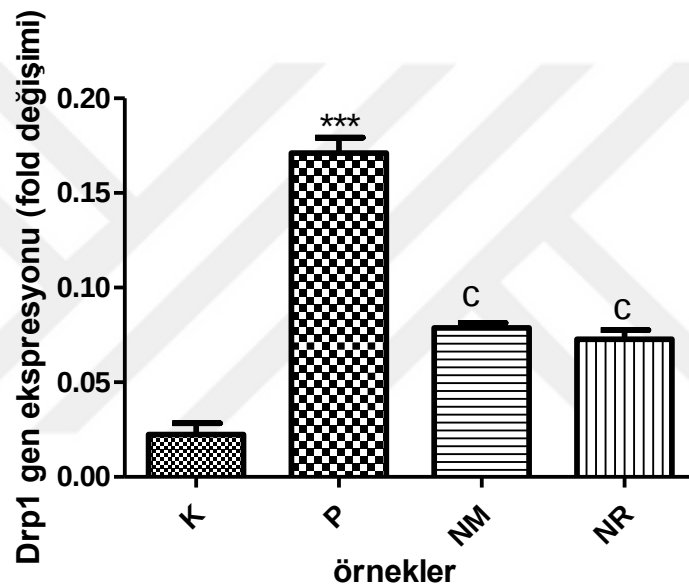
Kontrol grubuna ait over kesitlerinde foliküllerdeki granüloza hücrelerinde hafif düzeyde Drp1 pozitivitesi izlendi (Drp1 pozitivite skoru: 0(0-1)). Polikistik over sendromu grubuna ait over kesitlerinde korpus luteumlar da dahil olmak üzere hemen hemen her yapıda, özellikle foliküllerin granüloza hücrelerinde aşırı yoğun Drp1 pozitivitesi görüldü (Drp1 pozitivite skoru: 3(3-3)). Nikotinamid mononükleotit tedavi grubuna preantral folikülleri granüloza hücrelerinde ve teka hücre tabakasında Drp1 pozitivitesinde azalma gözlemlendi (Drp1 pozitivite skoru: 2(1-2)). Nikotinamid ribozid tedavi grubuna ait over dokusunda preantral foliküllerde granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde de Drp1 pozitivitesinin azaldığı gözlemlendi (Drp1 pozitivite skoru: 2(-2)) (Şekil 4.12.) (Tablo 4.1.)



Şekil 4.12. Drp1 primer antikoru ile inkube edilmiş over dokusuna ait temsili ışık mikroskopik ekran görüntüsü. A(x10)-B(x20): Kontrol grubuna ait over kesitleri, hafif düzeyde Drp1 ekspresyonu (ok başları), C(x20)-D(x40): PKOS grubuna ait over kesitleri, şiddetli düzeyde Drp1 ekspresyonu kıvrımlı (ok başları) E(x20)-F(x40): NMN tedavi grubuna ait over kesitleri, hafif şiddette Drp1 ekspresyonu (ok başları), G(x20)-H(x40): NR tedavi grubuna ait over kesitleri, hafif şiddette Drp1 ekspresyonu (ok başları)

4.4. Moleküler Bulgular

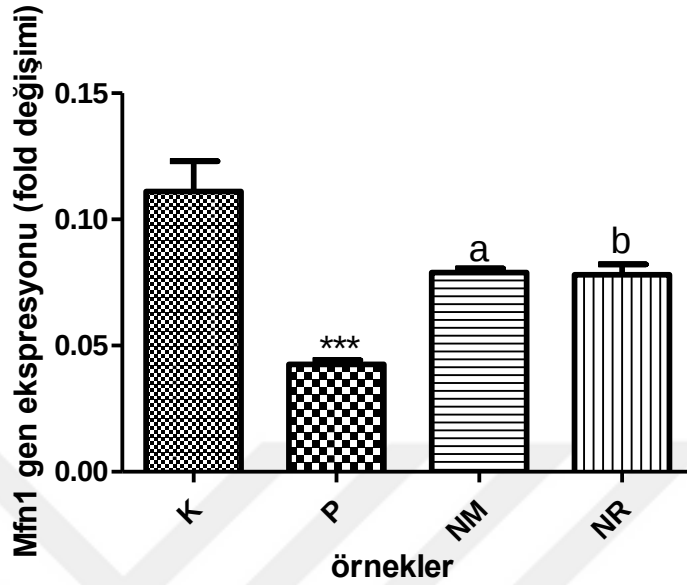
Bu çalışmada mitokondriyal stres sürecinde yer alan genlerin ekspresyon seviyeleri de değerlendirildi. Buna göre fisyon proteini olan Drp1'in ekspresyon seviyesi DHEA verilerek PKOS modeli oluşturulan grupta kontrol grubuna göre büyük bir artış gösterdi ($p<0.001$). Nikotinamid mononükleotit ve nikotinamid ribozid ile tedavi edilen gruplarda ise Drp1 seviyesinin PKOS grubuna göre düşük olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0.01$), (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Drp1 geninin örneklerde β -aktin kontrol genine göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren grafik. (K: kontrol, P: PKOS, NM: NMN. Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. *** $p<0.001$ vs kontrol ve c $p<0.001$ vs PKOS).

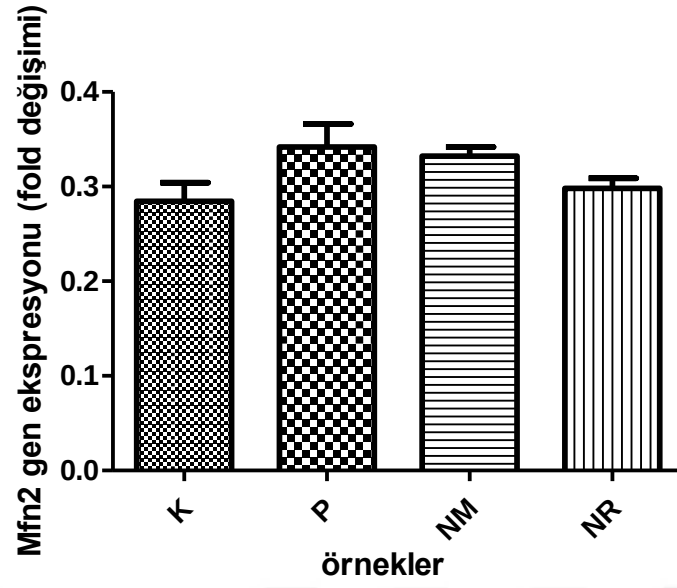
Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi yöntemiyle füzyon genlerinden Mfn1 seviyelerinin değişim grafiği Şekil 4.14'te gösterildi. Polikistik over sendromu grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında PKOS grubunda Mfn1 seviyesindeki düşüklük anlamlılık gösterdi ($p<0.01$). Polikistik over sendromu grubu ve NMN grubu karşılaştırıldığında NMN grubunda Mfn1 seviyesinde anlamlı bir yükseliş

gözlendi ($p<0.05$). Polikistik over sendromu ve NR grupları karşılaştırıldığında ise NR grubunda Mfn1 seviyesinde artış gözlendi ($p<0.01$).



Şekil 4.14. Mfn1 geninin örneklerde β -aktin kontrol genine göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren grafik. (K: kontrol, P: PKOS, NM: NMN. Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. *** $p<0.001$ vs kontrol, a $p<0.05$ vs PKOS ve b $p<0.01$ vs PKOS).

Mitofusin 2 gen seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol, PKOS, NMN ve NR grupları arasında herhangi bir anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Mfn2 geninin örneklerde β -aktin kontrol genine göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren grafik. (K: kontrol, P: PKOS, NM: NMN. Veriler data $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. Örneklerin birbirine göre istatistiksel önem derecesinde farkı yoktur).

5. TARTIŞMA

Anovulatuvar infertilitenin en bilinen sebeplerinden biri PKOS'tur.^{51, 62} Polikistik over sendromlu kadınların çok büyük bir kısmı ovulatuvar sorunlar olmasına karşın bazen bu kişilerde ovulasyon gerçekleşebilir.^{172, 173} Polikistik over sendromlu olup düzenli menstrüel döngüleri olan kadınlar da anovulatuvar olabilirler.^{174, 175} Dehidroepiandrosteron ile indüklediğimiz polikistik over modelinde sıçanların menstrual döngülerini vajinal sürüntü yöntemiyle incelediğimizde over siklusunun bozulması, histolojik incelemede ise antral foliküllerin dramatik bir şekilde az olması anovulasyonun göstergesidir ve modelin oturduğunun kanıtıdır.

Polikistik over sendromunun hücresel ve moleküler temelini incelemede yaygın bir yaklaşım, hayvan modellerinin kullanılmasıdır. Karmaşık yapısı nedeniyle insan PKOS'u için şu anda "mükemmel" bir hayvan modeli bulunmamakla birlikte, androjenize sıçan modelinin, insandaki PKOS'un birçok fenotipini taklit ettiği için yararlı olduğu kanıtlanmıştır.^{140, 176, 177} Bu çalışmada DHEA ile indüklenen bir sıçan modeli kullanıldı ve yumurtalığın yapısal özelliklerini, granüloza hücre apoptozunu ve mitokondriyal stres süreci incelenerek modelin etkinliği değerlendirildi ve bu fizyopatolojik bulguların NMN ve NR tedavileri sonucu iyileşip iyileşmediği araştırıldı. Bu modelde insandakine benzer şekilde erken antral granüloza hücre apoptozu, foliküler büyüme durması, bozulmuş folikülogenez, polikistik yapılar ve anovulasyon indüksiyonu bulundu, ancak sistemik değişiklikler (örn. anlamlı vücut ağırlığı değişiklikleri) gözlenmedi.

Polikistik over sendromuna ekseriyetle eşlik eden obezite de anovulasyon için fazladan bir risk faktörüdür.¹⁷⁸ Obez ve obez olmayan PKOS'lu hastalarda ovulatuvar işlev bozukluğu farklıdır.¹⁷⁹ Normal kilodaki PKOS hastalarında yüksek LH seviyesi ve ovaryan hiperandrojenizmi folikül gelişimindeki bozukluğu yöneten baş aktörlerdir.¹⁸⁰

Böyle hastalardaki insülin de ovaryan steroidogenezine ve granüloza hücresi farklılaşmasına etki eden gonadotropinlerin faaliyetini artırır.¹⁸⁰ Obez PKOS hastalarda ise, anormal glukoz-insülin homeostazı ve adipojenik fonksiyon bozukluğu gibi metabolik faktörler folikül ve oosit gelişimindeki aksamada LH'tan daha önemli olabilir. Bu farklılık, birçok obez PKOS hastasında kilo vermenin üretkenliği ve ovulasyonu geri getirmesine rağmen; normal kilodaki PKOS hastalarında ovulasyon indüksiyonuna ihtiyaç duyulduğunu gösterir.^{52, 58, 179} Bu çalışmada onar günlük kilo artışlarını incelediğimizde tüm hayvanların gelişme çağında olması hasebiyle hepsinde kilo artışı görüldü. Ancak, gruplar arasında kilo artışı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Polikistik over sendromunun fizyopatolojisi ile ilgili öne sürülen mekanizmalardan biri, LH artışına bağlı olarak teka hücrelerinde meydana gelen androjen üretiminin artmasıdır.^{7, 8, 90} Polikistik over sendromu grubundaki hayvanların LH /FSH oranına bakıldığında literatürle uyumlu olarak ciddi bir artış görülmektedir. Nikotinamid mononükleotit ve nikotinamid ribozid grubunda ise bu seviyenin normale döndüğü açıkça görülmektedir. Histopatolojide de bu durumu doğrularcasına PKOS grubunda hormon üretimindeki artıştan dolayı kalın bir teka hücre tabakası görülmektedir. Dahası teka hücrelerinde hipertrofi olduğu da gözlenmektedir. NMN ve NR gruplarında ise bu patolojinin giderildiği görüldü.

Polikistik over sendromunun etiyolojisi, karmaşık ve heterojen doğası nedeniyle belirsiz kalsa da, granüloza hücre apoptozunun PKOS'un patogenezi ile ilişkili foliküler büyüme durmasında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür.^{181, 182} Polikistik over sendromu için altta yatan mekanizmalar hala bilinmemekle birlikte, PKOS hastalarının granüloza hücrelerinde inflamasyon, NAD⁺ düzeylerinde azalma ve mitokondriyal disfonksiyon bildirilmiştir.^{140, 183}

Bu çalışmada DHEA ile indüklenen sıçan modelinde mitokondriyal fisyon ve füzyon dinamiklerinin düzensizliği gösterildi. Bu bulgular, granüloza hücrelerindeki mitokondriyal dinamiklerin önemini ve hücre ölümünü düzenleyici süreçlerdeki düzensizliğin PKOS patogenezinde nasıl rol oynayabileceğini vurgulamaktadır. *Drosophila*'da yapılan çalışmalarda, Drp1 yoksunluğuna bağlı folikül hücrelerinde apoptozise karşı direnç azaldığı ve yumurtalık gelişim kusurları ortaya çıktığı tespit edilmiştir.¹¹⁸ Oosit spesifik Drp1 nakavt farelerde yapılan çalışmalarda, oositte mitokondriyal deformiteler, folikül gelişimde duraksama, granüloza hücrelerinin proliferasyonunda azalma ve anovulasyon gözlemlenmiştir.¹¹⁹ Literatürde PKOS'lu over dokusunda parenkimal hücrelerde mitofaji, otofaji ve apoptotik hücre ölümü iyi bir şekilde tanımlanmasına rağmen bu patafizyolojik süreçlerle kuvvetli ilişkili olan mitokondriyal fisyon ve füzyon dinamikleri yeterince araştırılmamıştır.^{17, 184} Çalışmamızda diğer gruplara oranla PKOS grubunda fisyon proteini olan Drp1'in çok yüksek üretildiği, füzyon proteini olan Mfn1'in ise düşük seviyelerde seyrettiği gözlemlendi. Mitokondriyal fisyon sırasında, Drp1 mitokondriyal membrana alınır ve iki yavru mitokondri oluşturmak için mitokondriyi saran ve daraltan bir oligomer zinciri oluşturur.¹²⁵ Dynamin-ilişkili protein 1'in aktivitesi, fosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara bağlıdır. DRP 1 (Ser635) sikline bağımlı kinaz 1 / siklin B kompleksi tarafından fosforile edildiğinde mitokondriyal fisyon başlatılırken, DRP 1 (Ser656) PKA tarafından fosforile edildiğinde Drp1 işlevi inhibe edilir ve mitokondriyal dinamikler, mitokondriyal füzyona doğru kayar.^{185, 186} Dehidroepiandrosteron ile indüklenen sıçan modelimizde Drp1'in ekspresyonunun artması mitokondriyal dinamiklerin mitokondriyal füzyon yerine mitokondriyal fisyona kaydığını göstermektedir. Biz bu tez çalışmasına başladıktan sonra 2020 yılında Salehi ve arkadaşları yayınladıkları çalışmada sıçanlarda DHEA ile indüklenmiş PKOS

modelinde Drp1'in artışına bağlı olarak mitokondriyal fisyonun overlerde granüloza hücrelerinde arttığını ve aynı çalışmada Drp1 aktivitesinde artışa bağlı olarak mitofaji, otofaji ve apoptotik hücre ölümlerinin arttığını benzer şekilde göstermişlerdir.¹⁴⁰ Tarafımızca yapılan bu çalışmada da artan Drp1 ekspresyonuna bağlı olarak granüloza hücrelerinde artan apoptotik hücre ölümleri gözlemlenmiştir.

Literatürde hücrelerde meydana gelen aşırı mitokondriyal fisyonun apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiği birçok çalışmayla belirtilmesine rağmen bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır.¹⁷ Mitokondriyal fisyonun indüklenmesi ve bunun mitokondri dış zarı, kristanın yeniden şekillenmesi ve apoptoz sırasında sitokrom c salınımı ile ilişkisi için 3 tane mekanizma öne sürülmüştür:

(a) Apoptotik sinyaller, Bax ve Drp1'in mitokondride yer değiştirmesini tetikler. Daha sonra, aktif Bax, Drp1 aracılı mitokondri fisyonunun aktivasyonuna katılır ve ayrıca Mfn2 ile etkileşime girerek mitokondriyal füzyonu inhibe edebilir. Kristanın yeniden şekillenmesi, muhtemelen fisyon aktivasyonu ve/veya füzyonun inhibisyonu ile bağlantılı bilinmeyen bir mekanizma tarafından meydana gelir. Aktif Bax, dış mitokondriyal membran boyunca kanallar oluşturarak sitokrom c salınımına neden olur.^{129, 187, 188}

(b) Apoptotik sinyaller, endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını indükler, bu da Drp1'in mitokondriye translokasyonu ve parçalanmanın indüklenmesi ile sonuçlanır. Bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla Drp1, kristanın yeniden şekillenmesini tetikler. Ardından, mitokondri dış zarında Bax translokasyonu ve Bax içeren kanalların oluşumu sitokrom c salınımını tetikler.^{189, 190}

(c) Apoptotik sinyaller, Bax'ın mitokondriye translokasyonunu tetikler. Aktif Bax, sitokrom c ve OPA1'in bir kısmı ve DDP/TIMM8a gibi intermembran boşlukta lokalize olan bazı çözünür proteinlerin salınımını indükleyen kanallar oluşturur. OPA1

salınımı, kalan sitokrom c'nin salınmasına izin vermek için kristanın yeniden şekillenmesini tetikler ve bu, mitokondriyal füzyonun inhibisyonu ile ilişkilidir. Paralel olarak, sitozolde bir kez, DDP/TIMM8a, Drp1'e bağlanır ve mitokondriye translokasyonunu ve Drp1 aracılı fisyonun indüklenmesini teşvik eder.¹⁸⁶

Mitokondride fisyon sonucu sitozole bırakılan sitokrom C, Apaf1 ile birleşerek apoptozom kompleksini aktive eder. Apoptozom kompleksinin aktive olması kaspaz 9 ve kaspaz 3 yolağı ile hücreyi apoptotik ölüme götürür.^{191, 192}

Çalışmamızda PKOS grubunda gözlemlediğimiz mitokondriyal füzyonda rol oynayan Mfn1 ekspresyonunun azalması yukarda izah edilen mekanizmalarda mitokondriyal fisyonla ait yolların füzyonu engellemesiyle ilişkilidir.

Çalışmamızda NMN ve NR ile tedavi edilen gruplarda sağlıklı foliküller ve sağlıklı folikül mikroçevresi görüldü. Kistik yapıların önemli derecede azalması da önemli bir bulgudur. Bu gruplarda Drp1 ve Mfn1 seviyelerinin kontrol grubundaki seviyeye yaklaştığı görülmektedir. Bu durum hücrelerdeki mitokondriyal stresin ortadan kalktığına bir işareti olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte Mfn2 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel bir fark olmaması hücrelerde Mfn2 proteinlerinin yeterli seviyede olmasından dolayı transkripsiyona ihtiyaç duyulmaması şeklinde yorumlanabilir. Her iki tedavi grubunda da artan Mfn1 ekspresyon seviyeleri mitokondriyal dinamiklerin fisyondan ziyade füzyona kaymasına sebep olmuştur.

Mitokondriyal anormalliklere katkıda bulunan bir faktör, çoklu metabolik reaksiyonlarda önemli bir kofaktör olan nikotinamid adenin dinükleotidinin (NAD^+) kaybıdır. NAD^+ 'ın mitokondride hücre içi metabolik yolda hidrojen transferine ve redoks reaksiyonuna aracılık ettiği bilinmektedir^{162, 193, 194}. NAD^+ 'ın ayrıca, metabolizmaya ve oksidatif strese hücrel yanıtı modüle etmede SIRT1'in rolünü destekleyen ve birçok önemli enzimatik reaksiyon için vazgeçilmez bir kofaktör olduğu

bulunmuştur.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Hücresel NAD(H) seviyelerinin tükenmesi daha sonra biyoenerjetik başarısızlık ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır.^{194, 198, 199} Bu nedenle, hücresel NAD⁺ seviyelerini korumak için alternatif bir strateji, NAD⁺ öncüllerini uygulamaktır.

Nikotinamid mononükleotit ve öncüsü nikotinamid ribozid, hücresel NAD⁺ mevcudiyetini artırarak ve dolayısıyla enerji kapasitesini geliştirerek ve sirtuin deasetilaz aktivitesini aktive ederek mitokondriyal sağlığı iyileştirdiği varsayılmıştır.²² Sirtuinler deasetilaz tepkimelerinde, substrattan asetil grubunun koparılmasıyla NAD⁺'ın ADP-riboz kısmına aktarımını katalizler.²⁵ Bir NAD⁺ öncüsü olan NMN takviyesinin NAD⁺ içeriğini ve SIRT1 aktivitesini restore eder.²⁵ Sirtuin 1, mitokondriyal gen ekspresyonu için önemli bir transkripsiyon faktörü olan PGC-1 alfa'yı deasetilatlar ve aktive eder, böylece mitokondriyal biyogenezi uyarır.^{146, 200, 201} Stres koşulları altında farklı hücre türlerinde PGC-1 alfa'nın mitokondriyal biyogenezin yanı sıra Mfn1 ve Mfn2 ekspresyon seviyelerini artırarak mitokondriyal füzyonu teşvik ettiği ve hücre sel sağ kalım ve mitokondriyal fonksiyonları düzelttiği tespit edildi.^{202, 203} Ayrıca yeni yapılan çalışmalarda, SIRT1 için Mfn2 substrat olduğu ve hipoksik koşullar altında SIRT1 aracılı Mfn1 deasetilasyonunu mitokondri füzyonu teşvik ettiği tespit edildi.^{146, 204, 205}

Long ve arkadaşları mitokondriyal solunum açıklarının iyileşmesini değerlendirmek için APP(swe)/PS1(AE9) çift transgenik (AD-Tg) farelerine bir NAD⁺ öncüsü olan NMN uygulamış ve beyindeki NAD⁺ katabolizmasının düzeldiğini görmüşlerdir.²⁰⁶ Trammell ve arkadaşları ise NR'nin bir NAD⁺ prokürsörü olduğunu bulmuşlardır.²⁷ Bu sonuç NR verdiğimiz grupta düzelen mitokondriyal sürecin nedenini açıklamaktadır.

Çalışmamızda, LH/FSH oranının tedavi uygulanan gruplarda anlamlı derecede düşerek kontrol grubu oranına yaklaşması, kontrol grubuna kıyasla PKOS grubunda

Drp1 seviyesinin yükselmesi, Mfn1'in düşmesi; tedavi gruplarında ise bu durumun düzelmesi PKOS'un iyileştirilmesine yönelik olarak yaptığımız bu çalışmanın amaçlarını desteklemektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında polikistik over sendromunda artan antral foliküldeki granüloza hücrelerinin apoptotik ölümüne neden olduğu antral folikül gelişiminin duraksaması mitokondriyal dinamiklerin füzyon yerine fisyon yönüne kaymasına bağlı olarak artan mitokondriyal stres ile kuvvetli ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu ilişkinin parametreleri olarak Drp1 ekspresyon seviyelerinin artışı ve füzyon proteinlerinden Mfn1 ekspresyon seviyelerinin azalmasıyla bağlantılı olduğunu tespit ettik. Bu durumdan yola çıkarak bu tez çalışmasında dişi sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan polikistik over sendromu modelinde NMN ve NR ile mitokondriyal stresini fisyon yönünden füzyona kaydırarak inhibe ettiği tespit edildi. Mitokondriyal stresin inhibisyonunun apoptotik hücre ölümünü engellediği ve buna bağlı olarak folikül gelişiminin devam ederek anovulasyonu giderdiği tespit edildi.

Tüm bu bulgulara ilaveten NMN ve NR tedavisinin overlerde kist oluşumunu önemli bir şekilde azalttığı ve LH/FSH oranını kontrol grubuna yaklaştırdığı görüldü.

Bu çalışmanın infertilite ile ilişkili PKOS tedavisinde yeni ve kuvvetli bir alternatif tedavi oluşturduğu gözlemlendiğinden bu çalışmanın dünyada ve ülkemizde yapılacak araştırmalara yön vereceği ve referans kaynağı olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jeanes YM, Reeves S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges. *Nutr Res Rev*, 2017, 30: 97-105.
2. McCartney CR, Marshall JC. CLINICAL PRACTICE. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*, 2016, 375: 54-64.
3. Sagvekar P, Dadachanji R, Patil K, Mukherjee S. Pathomechanisms of polycystic ovary syndrome: Multidimensional approaches. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2018, 10: 384-422.
4. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, Piltonen T, Norman RJ, International PN. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2018, 89: 251-268.
5. Malini NA, Roy George K. Evaluation of different ranges of LH:FSH ratios in polycystic ovarian syndrome (PCOS) - Clinical based case control study. *Gen Comp Endocrinol*, 2018, 260: 51-57.
6. Catteau-Jonard S, Brunel A, Dumont A, Robin G, Pigny P, Dewailly D. Serum FSH level is lower in dysovulating than in ovulating non-PCOS obese women, independently of body mass index. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2019, 80: 225-228.
7. Georgopoulos NA, Saltamavros AD, Decavalas G, Piouka A, Katsikis I, Panidis D. Serum AMH, FSH, and LH levels in PCOS. *Fertil Steril*, 2010, 93: e13; author reply e14.
8. Saadia Z. Follicle Stimulating Hormone (LH: FSH) Ratio in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) - Obese vs. Non- Obese Women. *Med Arch*, 2020, 74: 289-293.

9. Sharabidze N, Sabakhtarashvili M, Burkadze G. Proliferation and apoptosis in ovarian stromal hyperplasia and hyperthecosis. *Georgian Med News*, 2005: 26-29.
10. Alanbay I, Ercan CM, Sakinci M, Coksuer H, Ozturk M, Tapan S. A macrophage activation marker chitotriosidase in women with PCOS: does low-grade chronic inflammation in PCOS relate to PCOS itself or obesity? *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286: 1065-1071.
11. Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 122: 42-52.
12. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev*, 2016, 37: 467-520.
13. Wang F, Yu B, Yang W, Liu J, Lu J, Xia X. Polycystic ovary syndrome resembling histopathological alterations in ovaries from prenatal androgenized female rats. *J Ovarian Res*, 2012, 5: 15.
14. Zhang J, Bao Y, Zhou X, Zheng L. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17: 67.
15. Eriksen MB, Minet AD, Glinborg D, Gaster M. Intact primary mitochondrial function in myotubes established from women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96: E1298-1302.
16. Saeed N, Hamzah IH, Al-Gharrawi SAR. Polycystic ovary syndrome dependency on mtDNA mutation; copy Number and its association with insulin resistance. *BMC Res Notes*, 2019, 12: 455.
17. Kobayashi M, Yoshino O, Nakashima A, Ito M, Nishio K, Ono Y, Kusabiraki T, Kunitomi C, Takahashi N, Harada M, Hattori K, Orisaka M, Osuga Y, Saito S.

- Inhibition of autophagy in theca cells induces CYP17A1 and PAI-1 expression via ROS/p38 and JNK signalling during the development of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 508: 110792.
18. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 872-884.
 19. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 2006, 16: R551-560.
 20. Safaei Z, Bakhshalizadeh SH, Nasr Esfahani MH, Akbari Sene A, Najafzadeh V, Soleimani M, Shirazi R. Effect of Vitamin D3 on Mitochondrial Biogenesis in Granulosa Cells Derived from Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Fertil Steril*, 2020, 14: 143-149.
 21. Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, 2004, 305: 1747-1752.
 22. Yoshino J, Baur JA, Imai SI. NAD(+) Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab*, 2018, 27: 513-528.
 23. Bieganowski P, Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 2004, 117: 495-502.
 24. Fletcher RS, Ratajczak J, Doig CL, Oakey LA, Callingham R, Da Silva Xavier G, Garten A, Elhassan YS, Redpath P, Migaud ME, Philp A, Brenner C, Canto C, Lavery GG. Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. *Mol Metab*, 2017, 6: 819-832.
 25. Guan Y, Wang SR, Huang XZ, Xie QH, Xu YY, Shang D, Hao CM. Nicotinamide Mononucleotide, an NAD(+) Precursor, Rescues Age-Associated

- Susceptibility to AKI in a Sirtuin 1-Dependent Manner. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28: 2337-2352.
26. Kourtzidis IA, Dolopikou CF, Tsiftsis AN, Margaritelis NV, Theodorou AA, Zervos IA, Tsantarliotou MP, Veskoukis AS, Vrabas IS, Paschalis V, Kyparos A, Nikolaidis MG. Nicotinamide riboside supplementation dysregulates redox and energy metabolism in rats: Implications for exercise performance. *Exp Physiol*, 2018, 103: 1357-1366.
 27. Trammell SA, Yu L, Redpath P, Migaud ME, Brenner C. Nicotinamide Riboside Is a Major NAD⁺ Precursor Vitamin in Cow Milk. *J Nutr*, 2016, 146: 957-963.
 28. Wang S, Wan T, Ye M, Qiu Y, Pei L, Jiang R, Pang N, Huang Y, Liang B, Ling W, Lin X, Zhang Z, Yang L. Nicotinamide riboside attenuates alcohol induced liver injuries via activation of SirT1/PGC-1 α /mitochondrial biosynthesis pathway. *Redox Biol*, 2018, 17: 89-98.
 29. Andrews MC. Bilateral polycystic ovaries associated with sterility, amenorrhea and hirsutism. *Va Med Mon (1918)*, 1952, 79: 544-548.
 30. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *Fertil Steril*, 2002, 77: 91-97.
 31. Rotterdam EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2004, 81: 19-25.
 32. Brzana J, Yedinak CG, Hameed N, Plesiu A, McCartney S, Fleseriu M. Polycystic ovarian syndrome and Cushing's syndrome: a persistent diagnostic quandary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 175: 145-148.

33. Baskind NE, Balen AH. Hypothalamic-pituitary, ovarian and adrenal contributions to polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016, 37: 80-97.
34. Chaudhari N, Dawalbhakta M, Nampoothiri L. GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16: 37.
35. Azziz R, Adashi EY. Stein and Leventhal: 80 years on. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 214: 247 e241-247 e211.
36. Alkan I. Östradiol valerat ile oluşturulmuş polikistik over sendromu üzerine amitriptilinin olası etkilerinin araştırılması. *Histoloji ve Ebriyoloji A.B.D. Doktora Tezi*, Samsun: 19 Mayıs Üniversitesi, 2020.
37. Besler D. Deneysel polikistik over sıçan modelinde doku değişikliklerinin endokrin ve metabolik açıdan değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi*, Ege University: Ege University, 2009.
38. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG*, 2006, 113: 1210-1217.
39. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 2010, 25: 544-551.
40. Mehrabian F, Khani B, Kelishadi R, Ghanbari E. The prevalence of polycystic ovary syndrome in Iranian women based on different diagnostic criteria. *Endokrynol Pol*, 2011, 62: 238-242.

41. Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JJ, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. *Arch Intern Med*, 2006, 166: 2081-2086.
42. Çam ŞD. Polikistik over sendromu, idiyopatik hirsutizm ve idiyopatik hiperandrojenemisi olan hastaların optik koherans tomografi ile göz bulgularının karşılaştırılması. *Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık Tezi*, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2018.
43. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, Carmina E, Chang J, Yildiz BO, Laven JS, Boivin J, Petraglia F, Wijeyeratne CN, Norman RJ, Dunaif A, Franks S, Wild RA, Dumesic D, Barnhart K. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*, 2012, 97: 28-38 e25.
44. Ndefo UA, Eaton A, Green MR. Polycystic ovary syndrome: a review of treatment options with a focus on pharmacological approaches. *P T*, 2013, 38: 336-355.
45. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF, Androgen Excess S. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91: 4237-4245.
46. Landay M, Huang A, Azziz R. Degree of hyperinsulinemia, independent of androgen levels, is an important determinant of the severity of hirsutism in PCOS. *Fertil Steril*, 2009, 92: 643-647.

47. Turner EI, Watson MJ, Perry LA, White MC. Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1992, 36: 389-397.
48. Burgers JA, Fong SL, Louwers YV, Valkenburg O, de Jong FH, Fauser BC, Laven JS. Oligoovulatory and anovulatory cycles in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): what's the difference? *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: E485-489.
49. Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. *Steroids*, 2013, 78: 782-785.
50. Jakimiuk AJ, Issat T. PCOS and cancer risk. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47: S101-105.
51. Adams J, Polson DW, Franks S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1986, 293: 355-359.
52. Katsikis I, Mouslech T, Kourtis A, Panidis D, Georgopoulos NA. Oligo-ovulation or anovulation and hyperandrogenemia contribute to the decreased serum adiponectin levels in normal-weight women with PCOS with obesity and insulin resistance. *Fertil Steril*, 2009, 91: e3; author reply e4.
53. van Santbrink EJ, Fauser BC. Ovulation induction in normogonadotropic anovulation (PCOS). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006, 20: 261-270.
54. Mateos Fournier M. Amenorrhea, hypomenorrhea, and oligomenorrhea. *Rev Med Cubana*, 1946, 57: 77-97.
55. Mateos Fournier M. Menstrual disorders; amenorrhea, hypomenorrhea, and oligomenorrhea. *Ginecol Obstet Mex*, 1948, 3: 23-38.

56. Elting MW, Korsen TJ, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J. Women with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when ageing. *Hum Reprod*, 2000, 15: 24-28.
57. Hart R, Hickey M, Franks S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004, 18: 671-683.
58. Castelo-Branco C, Steinvarcel F, Osorio A, Ros C, Balasch J. Atherogenic metabolic profile in PCOS patients: role of obesity and hyperandrogenism. *Gynecol Endocrinol*, 2010, 26: 736-742.
59. Jones H, Sprung VS, Pugh CJ, Daousi C, Irwin A, Aziz N, Adams VL, Thomas EL, Bell JD, Kemp GJ, Cuthbertson DJ. Polycystic ovary syndrome with hyperandrogenism is characterized by an increased risk of hepatic steatosis compared to nonhyperandrogenic PCOS phenotypes and healthy controls, independent of obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 3709-3716.
60. Zheng J, Yin Q, Cao J, Zhang B. Obesity contributes more to increasing ApoB/ApoA1 ratio than hyperandrogenism in PCOS women aged 20-38 years in China. *Exp Ther Med*, 2017, 13: 1337-1342.
61. Hart R. PCOS and infertility. *Panminerva Med*, 2008, 50: 305-314.
62. McGovern PG, Legro RS, Myers ER, Barnhart HX, Carson SA, Diamond MP, Carr BR, Schlaff WD, Coutifaris C, Steinkampf MP, Nestler JE, Gosman G, Leppert PC, Giudice LC, National Institutes for Child H, Human Development-Reproductive Medicine N. Utility of screening for other causes of infertility in women with "known" polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2007, 87: 442-444.

63. Balen AH, Tan SL, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone: a significant cause of infertility and miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*, 1993, 100: 1082-1089.
64. Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Body mass index and ovulatory infertility. *Epidemiology*, 1994, 5: 247-250.
65. Speroff L FM. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji İnfertilite Çeviri: M. Ü. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitap Evleri, 2007.
66. Trounson AO, Chamley WA, Kennedy JP, Tassell R. Primordial follicle numbers in ovaries and levels of LH and FSH in pituitaries and plasma of lambs selected for and against multiple births. *Aust J Biol Sci*, 1974, 27: 293-299.
67. Chapman JC, Min SH, Freeh SM, Michael SD. The estrogen-injected female mouse: new insight into the etiology of PCOS. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 47.
68. Diamanti-Kandarakis E, Kandarakis H, Legro RS. The role of genes and environment in the etiology of PCOS. *Endocrine*, 2006, 30: 19-26.
69. Rodriguez Paris V, Bertoldo MJ. The Mechanism of Androgen Actions in PCOS Etiology. *Med Sci (Basel)*, 2019, 7.
70. Buckler HM, Phillips SE, Kovacs GT, Burger HG, Healy DL. GnRH agonist administration in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1989, 31: 151-165.
71. Dash RJ, Sialy R, Rao NS. LH and FSH responses to GnRH in health and disease. *J Steroid Biochem*, 1985, 23: 823-826.
72. De Nicolao G, Liberati D, Veldhuis JD, Sartorio A. LH and FSH secretory responses to GnRH in normal individuals: a non-parametric deconvolution approach. *Eur J Endocrinol*, 1999, 141: 246-256.

73. Prelevic G, Vircburger M, Popovic A, Mariankovic Z, Peric L. [Response of LH and FSH to GnRH in patients with the polycystic ovary syndrome]. *Srp Arh Celok Lek*, 1985, 113: 433-442.
74. Wu C, Wei K, Jiang Z. 5alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15: 21.
75. Restuccia DF, Hynx D, Hemmings BA. Loss of PKBbeta/Akt2 predisposes mice to ovarian cyst formation and increases the severity of polycystic ovary formation in vivo. *Dis Model Mech*, 2012, 5: 403-411.
76. Vigersky RA, Loriaux DL. An androgen binding protein in the cyst fluid of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1976, 43: 817-823.
77. Fulghesu AM, Lanzzone A, Fortini A, Guido M, Caruso A, Mancuso S. Evaluation of ovarian and adrenal sources of androgens in women with polycystic ovary syndrome. Dexamethasone and GnRH-agonist administration. *J Reprod Med*, 1993, 38: 387-392.
78. Leondires MP, Berga SL. Role of GnRH drive in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*, 1998, 21: 476-485.
79. Ibanez L, Potau N, Carrascosa A. Insulin resistance, premature adrenarche, and a risk of the Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Trends Endocrinol Metab*, 1998, 9: 72-77.
80. Nader S. Adrenarche and polycystic ovary syndrome: a tale of two hypotheses. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2007, 20: 353-360.

81. van Weissenbruch MM. Premature adrenarche, polycystic ovary syndrome and intrauterine growth retardation: does a relationship exist? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007, 14: 35-40.
82. Deichsel K, Hoppen HO, Bruckmaier R, Kolm G, Aurich C. Acute insulin-induced hypoglycaemia does not alter IGF-1 and LH release in cyclic mares. *Reprod Domest Anim*, 2005, 40: 117-122.
83. Monte APO, Barros VRP, Santos JM, Menezes VG, Cavalcante AYP, Gouveia BB, Bezerra MES, Macedo TJS, Matos MHT. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the sheep ovary and the synergistic effect of IGF-1 and FSH on follicular development in vitro and LH receptor immunostaining. *Theriogenology*, 2019, 129: 61-69.
84. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*, 1981, 108: 1441-1449.
85. Barbieri RL, Makris A, Ryan KJ. Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. *Fertil Steril*, 1983, 40: 237-241.
86. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev*, 1995, 16: 322-353.
87. Nestler JE, Strauss JF, 3rd. Insulin as an effector of human ovarian and adrenal steroid metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1991, 20: 807-823.
88. Qu X, Donnelly R. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) as an Early Biomarker and Therapeutic Target in Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Sci*, 2020, 21.

89. Nam Menke M, Strauss JF, 3rd. Genetics of polycystic ovarian syndrome. Clin Obstet Gynecol, 2007, 50: 188-204.
90. Cadagan D, Khan R, Amer S. Thecal cell sensitivity to luteinizing hormone and insulin in polycystic ovarian syndrome. Reprod Biol, 2016, 16: 53-60.
91. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med, 2005, 352: 1223-1236.
92. Papalou O, Victor VM, Diamanti-Kandarakis E. Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. Curr Pharm Des, 2016, 22: 2709-2722.
93. Wu C, Lin F, Qiu S, Jiang Z. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. PLoS One, 2014, 9: e99155.
94. Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. Endocrinology, 2007, 148: 3781-3791.
95. Azhary JMK, Harada M, Takahashi N, Nose E, Kunitomi C, Koike H, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Endoplasmic Reticulum Stress Activated by Androgen Enhances Apoptosis of Granulosa Cells via Induction of Death Receptor 5 in PCOS. Endocrinology, 2019, 160: 119-132.
96. Banuls C, Rovira-Llopis S, Martinez de Maranon A, Veses S, Jover A, Gomez M, Rocha M, Hernandez-Mijares A, Victor VM. Metabolic syndrome enhances endoplasmic reticulum, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in PCOS. Metabolism, 2017, 71: 153-162.
97. Yao LQ, Kuang JQ, Feng YJ, Yang DZ, Li L, Xu CJ. Characterization of unilateral polycystic ovary compared with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, 2006, 85: 805-808.

98. Wang T, Zhang J, Hu M, Zhang Y, Cui P, Li X, Li J, Vestin E, Brannstrom M, Shao LR, Billig H. Differential Expression Patterns of Glycolytic Enzymes and Mitochondria-Dependent Apoptosis in PCOS Patients with Endometrial Hyperplasia, an Early Hallmark of Endometrial Cancer, In Vivo and the Impact of Metformin In Vitro. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 714-725.
99. Bohovych I, Chan SS, Khalimonchuk O. Mitochondrial protein quality control: the mechanisms guarding mitochondrial health. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22: 977-994.
100. Pickles S, Vigie P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol*, 2018, 28: R170-R185.
101. ter Schegget J, Flavell RA, Borst P. DNA synthesis by isolated mitochondria. 3. Characterization of D-loop DNA, a novel intermediate in mtDNA synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1971, 254: 1-14.
102. Kornmann B. Quality control in mitochondria: use it, break it, fix it, trash it. *F1000Prime Rep*, 2014, 6: 15.
103. Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *Int J Mol Sci*, 2018, 19.
104. Vitali DG, Kaser S, Kolb A, Dimmer KS, Schneider A, Rapaport D. Independent evolution of functionally exchangeable mitochondrial outer membrane import complexes. *Elife*, 2018, 7.
105. Becker T, Wagner R. Mitochondrial Outer Membrane Channels: Emerging Diversity in Transport Processes. *Bioessays*, 2018, 40: e1800013.
106. Drummond-Main CD, Rho JM. Electrophysiological characterization of a mitochondrial inner membrane chloride channel in rat brain. *FEBS Lett*, 2018, 592: 1545-1553.

107. Choo HJ, Kholmukhamedov A, Zhou C, Jobe S. Inner Mitochondrial Membrane Disruption Links Apoptotic and Agonist-Initiated Phosphatidylserine Externalization in Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37: 1503-1512.
108. Wei Y, Chiang WC, Sumpter R, Jr., Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*, 2017, 168: 224-238 e210.
109. Bragoszewski P, Turek M, Chacinska A. Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open Biol*, 2017, 7.
110. Melber A, Haynes CM. UPR(mt) regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res*, 2018, 28: 281-295.
111. Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833: 274-285.
112. Pfanner N, Meijer M. The Tom and Tim machine. *Curr Biol*, 1997, 7: R100-103.
113. Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol*, 1988, 107: 481-495.
114. Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol*, 2015, 4: 6-13.
115. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*, 2018, 62: 341-360.
116. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 870-879.

117. Alavi MV, Fuhrmann N. Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics. *Mol Neurodegener*, 2013, 8: 32.
118. Mitra K, Rikhy R, Lilly M, Lippincott-Schwartz J. DRP1-dependent mitochondrial fission initiates follicle cell differentiation during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol*, 2012, 197: 487-497.
119. Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M, Mihara K, Mizushima N, Ishihara N. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr Biol*, 2014, 24: 2451-2458.
120. Silva Ramos E, Larsson NG, Mourier A. Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857: 1277-1283.
121. Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, Sanderson TH. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 2547-2564.
122. Dahlmans D, Houzelle A, Schrauwen P, Hoeks J. Mitochondrial dynamics, quality control and miRNA regulation in skeletal muscle: implications for obesity and related metabolic disease. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130: 843-852.
123. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*, 2016, 212: 379-387.
124. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27: 105-117.
125. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, 2009, 324: 102-105.

126. Zepeda R, Kuzmicic J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, Pedrozo Z, Chiong M, Sanchez G, Lavandero S. Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63: 477-487.
127. Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 20-26.
128. Sesaki H, Adachi Y, Kageyama Y, Itoh K, Iijima M. In vivo functions of Drp1: lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 1179-1185.
129. Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, Manstein DJ, Bossy-Wetzel E, Basanez G, Meda P, Martinou JC. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell*, 2010, 142: 889-901.
130. Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837: 461-469.
131. Richter V, Singh AP, Kvensakul M, Ryan MT, Osellame LD. Splitting up the powerhouse: structural insights into the mechanism of mitochondrial fission. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 3695-3707.
132. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 2011, 67: 103-118.

133. Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol*, 1998, 143: 359-373.
134. Harvey AJ. Mitochondria in early development: linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction*, 2019, 157: R159-R179.
135. Baker MJ, Palmer CS, Stojanovski D. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 1870-1889.
136. Dorn GW, 2nd. Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annu Rev Physiol*, 2019, 81: 1-17.
137. Kiriya Y, Nochi H. Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms of Mitochondria. *Cells*, 2017, 7.
138. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 2008, 456: 605-610.
139. Shukla P, Mukherjee S. Mitochondrial dysfunction: An emerging link in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Mitochondrion*, 2020, 52: 24-39.
140. Salehi R, Mazier HL, Nivet AL, Reunov AA, Lima P, Wang Q, Fiocco A, Isidoro C, Tsang BK. Ovarian mitochondrial dynamics and cell fate regulation in an androgen-induced rat model of polycystic ovarian syndrome. *Sci Rep*, 2020, 10: 1021.
141. Choi JY, Jo MW, Lee EY, Yoon BK, Choi DS. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertil Steril*, 2010, 93: 2532-2537.
142. Imai S, Guarente L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol*, 2014, 24: 464-471.
143. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 2009, 460: 587-591.

144. Lin S, Xing H, Zang T, Ruan X, Wo L, He M. Sirtuins in mitochondrial stress: Indispensable helpers behind the scenes. *Ageing Res Rev*, 2018, 44: 22-32.
145. Poulouse N, Raju R. Sirtuin regulation in aging and injury. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852: 2442-2455.
146. Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells*, 2016, 39: 87-95.
147. Olmos Y, Brosens JJ, Lam EW. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resist Updat*, 2011, 14: 35-44.
148. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004, 303: 2011-2015.
149. Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med*, 2005, 16: 237-243.
150. Liang W, Li X, Li G, Hu L, Ding S, Kang J, Shen J, Li C, Asakawa T. Sirt1/Foxo Axis Plays a Crucial Role in the Mechanisms of Therapeutic Effects of Erzhi Pill in Ovariectomized Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9210490.
151. Mitchell SJ, Martin-Montalvo A, Mercken EM, Palacios HH, Ward TM, Abulwerdi G, Minor RK, Vlasuk GP, Ellis JL, Sinclair DA, Dawson J, Allison DB, Zhang Y, Becker KG, Bernier M, de Cabo R. The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet. *Cell Rep*, 2014, 6: 836-843.

152. Song SB, Park JS, Jang SY, Hwang ES. Nicotinamide Treatment Facilitates Mitochondrial Fission through Drp1 Activation Mediated by SIRT1-Induced Changes in Cellular Levels of cAMP and Ca(2). *Cells*, 2021, 10.
153. Chen Y, Liang Y, Hu T, Wei R, Cai C, Wang P, Wang L, Qiao W, Feng L. Endogenous Nampt upregulation is associated with diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis through the NF-kappaB p65 and Sirt1 pathway; NMN alleviates diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis by inhibiting endogenous Nampt. *Exp Ther Med*, 2017, 14: 4181-4193.
154. Deng X, Liang X, Yang H, Huang Z, Huang X, Liang C, Kuang Y, Qin Y, Lin F, Luo Z. Nicotinamide mononucleotide (NMN) protects bEnd.3 cells against H₂O₂-induced damage via NAMPT and the NF-kappaB p65 signalling pathway. *FEBS Open Bio*, 2021, 11: 866-879.
155. Spinnler R, Gorski T, Stolz K, Schuster S, Garten A, Beck-Sickinger AG, Engelse MA, de Koning EJ, Korner A, Kiess W, Maedler K. The adipocytokine Nampt and its product NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secretion. *PLoS One*, 2013, 8: e54106.
156. Zapata-Perez R, Tammara A, Schomakers BV, Scantlebery AML, Denis S, Elfrink HL, Giroud-Gerbetant J, Canto C, Lopez-Leonardo C, McIntyre RL, van Weeghel M, Sanchez-Ferrer A, Houtkooper RH. Reduced nicotinamide mononucleotide is a new and potent NAD(+) precursor in mammalian cells and mice. *FASEB J*, 2021, 35: e21456.
157. Plaut GW, Plaut KA. A method for the purification of nicotinamide mononucleotide. *Arch Biochem Biophys*, 1954, 48: 189-192.

158. Streffer C, Benes J. Nicotinamide mononucleotide. Determination of its enzymatic formation in vitro and its physiological role for the biosynthesis of nicotinamide-adenine dinucleotide in mice. *Eur J Biochem*, 1971, 21: 357-362.
159. Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem*, 2005, 280: 36334-36341.
160. Lau C, Niere M, Ziegler M. The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14: 410-431.
161. Petrelli R, Felczak K, Cappellacci L. NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) and NAD kinase (NADK) inhibitors: chemistry and potential therapeutic applications. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 1973-1992.
162. Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, White JP, Teodoro JS, Wrann CD, Hubbard BP, Mercken EM, Palmeira CM, de Cabo R, Rolo AP, Turner N, Bell EL, Sinclair DA. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 2013, 155: 1624-1638.
163. Kiss T, Nyul-Toth A, Balasubramanian P, Tarantini S, Ahire C, Yabluchanskiy A, Csipo T, Farkas E, Wren JD, Garman L, Csiszar A, Ungvari Z. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes neurovascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of SIRT1 activation, mitochondrial protection, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects. *Geroscience*, 2020, 42: 527-546.
164. Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C. Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD⁺. *Cell*, 2007, 129: 473-484.

165. Canto C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, Fernandez-Marcos PJ, Yamamoto H, Andreux PA, Cettour-Rose P, Gademann K, Rinsch C, Schoonjans K, Sauve AA, Auwerx J. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab*, 2012, 15: 838-847.
166. Trammell SA, Weidemann BJ, Chadda A, Yorek MS, Holmes A, Coppey LJ, Obrosova A, Kardon RH, Yorek MA, Brenner C. Nicotinamide Riboside Opposes Type 2 Diabetes and Neuropathy in Mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 26933.
167. Zhang H, Ryu D, Wu Y, Gariani K, Wang X, Luan P, D'Amico D, Ropelle ER, Lutolf MP, Aebersold R, Schoonjans K, Menzies KJ, Auwerx J. NAD(+) repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science*, 2016, 352: 1436-1443.
168. Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J Endocrinol*, 2006, 191: 549-558.
169. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
170. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F, Leclerc J, Duprez A, Weryha G. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 656-658.
171. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58: 95-107.

172. Fauser BC. Reproductive endocrinology: revisiting ovulation induction in PCOS. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10: 704-705.
173. Glanville EJ, Wilkinson J, Sadler L, Wong TY, Acharya S, Aziz N, Clarke F, Das S, Dawson J, Hammond B, Jayaprakasan K, Milner M, Shankaralingaiah N, Farquhar C, Lensen S. A randomized trial of endometrial scratching in women with PCOS undergoing ovulation induction cycles. *Reprod Biomed Online*, 2021.
174. Legro RS. Polycystic ovary syndrome. Phenotype to genotype. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1999, 28: 379-396.
175. Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Dunaif A. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res*, 1998, 53: 217-256.
176. Kim JY, Xue K, Cao M, Wang Q, Liu JY, Leader A, Han JY, Tsang BK. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 2013, 154: 2912-2923.
177. Wang Q, Kim JY, Xue K, Liu JY, Leader A, Tsang BK. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology*, 2012, 153: 5600-5611.
178. Thessaloniki EA-SPCWG. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2008, 89: 505-522.
179. Dumesic DA, Richards JS. Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2013, 100: 23-38.
180. Dumesic DA, Akopians AL, Madrigal VK, Ramirez E, Margolis DJ, Sarma MK, Thomas AM, Grogan TR, Haykal R, Schooler TA, Okeya BL, Abbott DH, Chazenbalk GD. Hyperandrogenism Accompanies Increased Intra-Abdominal Fat

- Storage in Normal Weight Polycystic Ovary Syndrome Women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101: 4178-4188.
181. Chen W, Pang Y. Metabolic Syndrome and PCOS: Pathogenesis and the Role of Metabolites. *Metabolites*, 2021, 11.
182. Walters KA, Bertoldo MJ, Handelsman DJ. Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2018, 32: 271-281.
183. Wang Y, Yang Q, Wang H, Zhu J, Cong L, Li H, Sun Y. NAD⁺ deficiency and mitochondrial dysfunction in granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod*, 2021, 105: 371-380.
184. Yi S, Zheng B, Zhu Y, Cai Y, Sun H, Zhou J. Melatonin ameliorates excessive PINK1/Parkin-mediated mitophagy by enhancing SIRT1 expression in granulosa cells of PCOS. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 319: E91-E101.
185. Kar UP, Dey H, Rahaman A. Regulation of dynamin family proteins by post-translational modifications. *J Biosci*, 2017, 42: 333-344.
186. Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, Sheng M, Blackstone C. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol*, 2005, 15: 2112-2118.
187. Brooks C, Cho SG, Wang CY, Yang T, Dong Z. Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300: C447-455.
188. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol*, 2002, 159: 931-938.

189. Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J*, 2005, 24: 1546-1556.
190. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingerman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR, Nunnari J. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*, 2008, 14: 193-204.
191. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, 2002, 419: 634-637.
192. Zou H, Yang R, Hao J, Wang J, Sun C, Fesik SW, Wu JC, Tomaselli KJ, Armstrong RC. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J Biol Chem*, 2003, 278: 8091-8098.
193. Canto C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab*, 2015, 22: 31-53.
194. Prolla TA, Denu JM. NAD⁺ deficiency in age-related mitochondrial dysfunction. *Cell Metab*, 2014, 19: 178-180.
195. Aksoy P, Escande C, White TA, Thompson M, Soares S, Benech JC, Chini EN. Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349: 353-359.

196. Lee IS, Chang JH, Kim DW, Kim SG, Kim TW. The effect of 4-hexylresorinol administration on NAD⁺ level and SIRT activity in Saos-2 cells. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2021, 43: 39.
197. Rouble AN, Storey KB. Characterization of the SIRT family of NAD⁺-dependent protein deacetylases in the context of a mammalian model of hibernation, the thirteen-lined ground squirrel. *Cryobiology*, 2015, 71: 334-343.
198. Hong Y, Nie H, Wei X, Fu S, Ying W. NAD⁺ treatment can prevent rotenone-induced increases in DNA damage, Bax levels and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in differentiated PC12 cells. *Neurochem Res*, 2015, 40: 837-842.
199. Klaidman LK, Mukherjee SK, Hutchin TP, Adams JD. Nicotinamide as a precursor for NAD⁺ prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Neurosci Lett*, 1996, 206: 5-8.
200. Akhtar S, Siragy HM. Pro-renin receptor suppresses mitochondrial biogenesis and function via AMPK/SIRT-1/ PGC-1alpha pathway in diabetic kidney. *PLoS One*, 2019, 14: e0225728.
201. Jiang Y, Chen D, Gong Q, Xu Q, Pan D, Lu F, Tang Q. Elucidation of SIRT-1/PGC-1alpha-associated mitochondrial dysfunction and autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*, 2021, 20: 40.
202. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93: 884S-890.
203. Zhang XX, Wu XS, Mi SH, Fang SJ, Liu S, Xin Y, Zhao QM. Neuregulin-1 promotes mitochondrial biogenesis, attenuates mitochondrial dysfunction, and prevents hypoxia/reoxygenation injury in neonatal cardiomyocytes. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38: 549-557.

204. Oanh NTK, Park YY, Cho H. Mitochondria elongation is mediated through SIRT1-mediated MFN1 stabilization. *Cell Signal*, 2017, 38: 67-75.
205. Liu J, Xu Y, Wu Q, Ding Q, Fan W. Sirtuin1 protects hair follicle stem cells from TNFalpha-mediated inflammatory stress via activating the MAPK-ERK-Mfn2 pathway. *Life Sci*, 2018, 212: 213-224.
206. Long AN, Owens K, Schlappal AE, Kristian T, Fishman PS, Schuh RA. Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease-relevant murine model. *BMC Neurol*, 2015, 15: 19.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Zeliha YETİM Doğum tarihi: Doğum Yeri: Medeni Hali: Uyruğu: Adres: Tel: Faks: E-mail:
Eğitim
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900107484
Konu : HADYEK Kararı.

01.04.2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 28.03.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900103044 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 28.03.2019 tarih ve 4 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 81 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ad: <http://www.atauni.edu.tr/birim-veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=SDOCF73>

TOPLANTI TARİHİ : 28.03.2019

TOPLANTI SAYISI : 4

KARAR NO 81: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Osman Nuri KELEŞ'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **"Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotiamid Ribozidin (NR) İle Mitokondriyal Stres İnhibisyonunun DHEA İle İndüklenmiş Polikistik Over Sendromlu Ratlarda Anovulasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması"** isimli tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 28.03.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900103044 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra, adı geçen tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

