



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Tıbbi Biyokimya

[Doktora Tezi]

**RAT POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE *TRPV1* VE *TRPM2* İYON
KANALLARININ EKSPRESYONUNUN VE METİLASYONUN ROLÜ**

Emine İncilay TORUNOĞLU
ORCID: 0000-0003-4641-0067

Doç. Dr. Turan AKDAĞ
ORCID: 0000-0003-3175-6751

İkinci Danışman
Prof. Dr. Bahattin AVCI
ORCID: 0000-0001-6471-6495

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri tarafından
23DR18007 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2026

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bilimsel araştırma süreci, yalnızca bireysel çabaların değil, aynı zamanda birçok kişinin bilgi, deneyim ve desteğinin bir araya gelmesiyle ilerleyen bir yolculuktur. Bu tez çalışmasının hazırlanması sürecinde katkı sunan, yol gösteren ve destek olan tüm değerli kişi ve hocalarıma teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Öncelikle, tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimi, rehberliği ve yapıcı yönlendirmeleriyle bana ışık tutan Prof. Dr. Mehmet Gürbilek ve danışmanım Doç.Dr. Turan Akdağ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel yaklaşımı, değerli katkıları ve destekleriyle çalışmalarımın şekillenmesine önemli katkı sağlayan Prof. Dr. Bahattin Avcı'ya teşekkür ederim. Epigenetik çalışmalarında deneysel süreçlerin yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Betül Zülfinaz Çelik'e içten teşekkür ederim. Tez çalışmamın tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen, motivasyon sağlayan Dr. Erdi Can Aytar'a gönülden teşekkür ederim. İstatistiksel analizlerin yapılmasında katkı sağlayan Dr. Alper Durmaz'a teşekkür ederim. Ayrıca jüri üyelerim Doç. Dr. Çiğdem Damla Deniz'e, Doc. Dr. Betül Aydın'a ve Prof. Dr. Hüseyin Kurku' ya değerli görüşleri ve yapıcı önerileriyle tez çalışmama katkı sağladıkları için teşekkür ederim. Bu süreç boyunca doğrudan veya dolaylı olarak katkı sağlayan, sabır ve anlayışlarını her zaman hissettiren rahmetli annem Meral Torunoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emine İncilay TORUNOĞLU

Nisan 2026

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Projenin Konusu ve Özgün Değeri.....	1
1.2. Amaç ve Hedefler.....	1
1.2.1. PKOS patogeneğinde iyon kanallarının rolü ve öneminin aydınlatılması	2
1.2.2. Tedavide kullanılan ajanların iyon kanalları üzerinden olası etkilerinin aydınlatılması	2
1.2.3. Semptomların tedavisi ve üreme fonksiyonlarının iyileştirilmesi.....	2
1.2.4. PKOS tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi.....	2
1.2.5. Ekonomiye katkı.....	2
1.2.6. Yayınlar ve bilimsel katkı	3
1.2.7. Sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesi	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Polikistik Over Sendromu	5
2.1.1. Tanım	5
2.1.2. Tarihçesi	5
2.1.3. Epidemiyolojisi	6
2.1.4. Etiyolojisi	8
2.1.5. Gelişimi	8
2.1.6. Patogenezi	9
2.2. Polikistik Over Sendromu Medikal Tedavi Yaklaşımları	11
2.2.1. Metformin.....	11
2.2.2. Kombine oral kontraseptifler.....	15
2.3. İyon Kanalları.....	17
2.3.1. Geçici reseptör potansiyel iyon kanalları	17
2.3.2. Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 (<i>Trpv1</i>) iyon kanalları.....	17
2.3.3. Geçici reseptör potansiyel melastatin-2 (<i>Trpm2</i>) iyon kanalları	18
2.4. Epigenetik ve PKOS ilişkisi.....	18

2. 5. DNA Metilasyonu ve PKOS ilişkisi.....	20
2. 6. Polikistik Over Sendrom Modelleri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Hayvan Etik Kurul Onayı.....	25
3.2. Deney Hayvanlarının Temini	25
3.3. Deney Grupları	25
3.4. Polikistik Over Sendrom Modeli.....	26
3.5. Vajinal Yayma.....	26
3.6. İlaç Uygulama Prosedürü	27
3.7. Deneyin Sonlandırılması	28
3.8. Rat Luteinizan Hormon (LH) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	29
3.9. Rat Follikül Stimulan Hormon (FSH) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	30
3.10. Rat Östradiol (E2) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	31
3.11. Rat Testosteron Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	32
3.12. Kan ve Dokuda RNA İzolasyonu	32
3.13. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi	33
3.13.1. RT-PCR analizi	34
3.14. Kan ve Over Dokularından DNA İzolasyonu	35
3.15. DNA'nın Bisülfid Modifikasyonu	36
3.16. Metilasyon Spesifik PCR (MSP).....	36
3.17. İstatistiksel Analizler.....	38
4. BULGULAR	39
4.1. PKOS Modeli	39
4.2. Canlı Ağırlık Bulguları.....	41
4.3. Serum FSH, LH, E2 ve Testosteron Konsantrasyonları.....	42
4.4. Kan ve Over Dokusunda <i>Trpv1</i> Gen Ekspresyonu	47
4.5. Kan ve Over Dokusunda <i>Trpm2</i> Gen Ekspresyonu	49
4.6. Kan ve Over Dokusunda <i>Trpv1</i> Promotör Metilasyonu.....	51
4.7. Kan ve Over Dokusunda <i>Trpm2</i> Promotör Metilasyonu.....	53
4.8. <i>Trpv1</i> ve <i>Trpm2</i> Genlerinin Over ve Kan Dokularında Promotör Metilasyon ile Ekspresyon İlişkisine Ait Korelasyon	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
6.1. Sonuç	67
6.2. Öneriler.....	67
7. KAYNAKLAR.....	69
8. EKLER.....	79
8.1. EK 1 Etik kurul kararı	79

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Doktora Öğrencisi **EMİNE İNCİLAY TORUNOĞLU**'nun "**Rat Polikistik Over Sendromu Modelinde *Trpv1* ve *Trpm2* İyon Kanallarının Ekspresyonunun ve Metilasyonun Rolü**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 10.04.2026

Tez Danışmanı	Doç. Dr. Üyesi Turan AKDAĞ Necmettin Erbakan Üniversitesi
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK Necmettin Erbakan Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç.Dr. Çiğdem Damla DENİZ Konya Şehir Hastanesi
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Hüseyin KURKU Necmettin Erbakan Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç.Dr. Betül AYDIN Gazi Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 22/04/2026 tarih ve 08/24 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

“Rat Polikistik Over Sendromu Modelinde *Trpv1* ve *Trpm2* İyon Kanallarının Ekspresyonunun ve Metilasyonun Rolü” başlıklı tez çalışmamın toplam 57 sayfalık kısmına ilişkin, 22. 04. 2026 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %8 olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Ön söz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%20) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

22/04/2026

Emine İncilay TORUNOĞLU

Doc. Dr. Turan AKDAĞ

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

10/04/2026

Emine İncilay TORUNOĞLU

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

°C: Santigrat derece

%: Yüzde

±: Artı/eksi

<: Küçüktür

>: Büyüktür

xg: Yerçekimi ivmesi katı (g kuvveti)

KISALTMALAR

ACC: Asetil-KoA karboksilaz
AMP: Adenozin monofosfat
AMPK: AMP ile aktive edilen protein kinaz
AMH: Anti-Müllerian hormon
ANOVA: Tek yönlü varyans analizi
ATP: Adenozin trifosfat
BER: Baz eksizyon onarımı
BMI: Vücut kitle indeksi
CaMKK2: Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz-2
CMC: Karboksimetil selüloz
Ct: Döngü eşiği
DNA: Deoksiribonükleik asit
DNMT: DNA metiltransferaz
DNMT1: DNA metiltransferaz-1
DNMT3a: DNA metiltransferaz-3 alfa
DNMT3b: DNA metiltransferaz-3 beta
dNTP: Deoksinükleotid trifosfat
E2: Östradiol
EE: Etinilöstradiol
EE/DRSP: Etinilöstradiol / Drospirenon
ELISA: Enzim bağılı immünosorbent analiz
FSH: Folikül stimülan hormon
GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GLUT: Glukoz taşıyıcı
HADYEK: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HOMA-IR: İnsülin direnci homeostaz modeli
HRP: Horseradish peroksidaz
IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGFBP-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1
LH: Lüteinizan hormon
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
MSP: Metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
NIH: National Institutes of Health
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKOS: Polikistik over sendromu
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAM: S-adenozilmetiyonin
SHBG: Seks hormon bağlayıcı globulin
Trp: Geçici reseptör potansiyel
Trpa1: Transient receptor potential ankyrin-1
Trpc: Transient receptor potential canonical
Trpm2: Transient receptor potential melastatin-2
Trpv1: Transient receptor potential vanilloid-1
Trpv2: Transient receptor potential vanilloid-2
USP: Unmetilasyona özgül primer

VKI: Vücut kitle indeksi

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı	34
Tablo 3.2. Revers transkriptaz termal döngü protokolü.....	34
Tablo 3.3. Metilasyon spesifik PCR primer dizileri.....	37
Tablo 4.1. Grupların sıçan canlı ağırlıkları (ortalama ± standart sapma)	41
Tablo 4.2. Kontrol grubu, PKOS grubu ve tedavi gruplarına ait FSH, LH, E2 ve testosteron konsantrasyonları (ortalama ± standart sapma).....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Polikistik overler ile normal over hücrelerinin karşılaştırılması.....	5
Şekil 2.2. Metformin kimyasal yapısı (https://molview.org/).....	12
Şekil 2.3. Metforminin hücresel etki mekanizmaları.....	14
Şekil 2.4. PKOS'ta metforminin hiperandrojenizm üzerindeki inhibitör etkisi.....	15
Şekil 2.5. Drospirenon kimyasal yapısı (https://molview.org/).....	16
Şekil 2.6. Etinilöstradiol kimyasal yapısı (https://molview.org/).....	16
Şekil 2.7. Letrozol kimyasal yapısı (https://molview.org/).....	22
Şekil 3.1. Kontrol, PKOS, MET, EE/DRSP ve MET + EE/DRSP deney grupları.....	26
Şekil 3.2. Vajinal yayma: Sıçanların östrus döngüsünün belirlenmesi.....	27
Şekil 3.3. Sıçanlara oral gavaj ile ilaçların verilmesi.....	28
Şekil 3.4. Sıçanları anestezi altına alınması, kalpten alınması ve over dokularının çıkarılması.....	29
Şekil 3.5. Kan ve over dokusundan RNA izolasyonunun aşamaları.....	33
Şekil 3.6. RNA örneklerinden komplementer DNA sentezi için cDNA reverse transkript kit.....	34
Şekil 3.7. Kan ve over dokusundan DNA izolasyon kit.....	35
Şekil 4.1. PKOS rat modelinde östrus siklusunun vajinal smear görüntülerimiz A) proöstrus, B) östrus, C) metaöstrus ve D) diöstrus evreleri.....	39
Şekil 4.2. A) Over dokusu kontrol grubu sağlıklı overler; B) Over dokusu PKOS grubunda oluşan polikistik görünüm.....	40
Şekil 4.3. Metformin grubu (A), EE/ DRSP grubu (B) ve Metformin + EE/DRSP grubuna (C) ait makroskopik over görüntüleri.....	40
Şekil 4.4. Grupların sıçan canlı ağırlıkları.....	41
Şekil 4.5. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum FSH konsantrasyonları.....	43
Şekil 4.6. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum LH konsantrasyonları.....	44
Şekil 4.7. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum E2 konsantrasyonları.....	45
Şekil 4.8. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum testosteron konsantrasyonları.....	46
Şekil 4.9. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum over dokusunda gen ekspresyon grafiği.....	47
Şekil 4.10. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum kan dokusunda gen ekspresyon grafiği.....	48
Şekil 4.11. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum over dokusunda gen ekspresyon grafiği.....	49
Şekil 4.12. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum kan dokusunda gen ekspresyon grafiği.....	50
Şekil 4.13. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda <i>Trpv1</i> geninin promotör metilasyonun metile/ unmetile oranı.....	51
Şekil 4.14. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda <i>Trpv1</i> geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	51

Şekil 4.15. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda <i>Trpv1</i> geninin promotör metilasyonun metile/ unmetile oranı	52
Şekil 4.16. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda <i>Trpv1</i> geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	52
Şekil 4.17. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda <i>Trpm2</i> geninin promotör metilasyonun metile/ unmetile oranı	53
Şekil 4.18. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda <i>Trpm2</i> geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	53
Şekil 4.19. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda <i>Trpm2</i> geninin promotör metilasyonun metile/ unmetile oranı	54
Şekil 4.20. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda <i>Trpm2</i> geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	54

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Tıbbi Biyokimya
[Doktora Tezi]

RAT POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE *Trpv1* VE *Trpm2* İYON KANALLARININ EKSPRESYONUNUN VE METİLASYONUN ROLÜ

Emine İncilay TORUNOĞLU

Konya-2026

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınlarda sık görülen, hiperandrojenizm, ovulatuvar disfonksiyon ve polikistik over morfolojisi ile karakterize kompleks bir endokrin ve metabolik bozukluktur. Bu tez çalışmasının amacı, ratlarda oluşturulan PKOS modelinde *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının gen ekspresyon düzeyleri ile promotör metilasyon durumlarını araştırmak ve PKOS tedavisinde yaygın olarak kullanılan metformin ile etinil östradiol/drospirenon (EE/DRSP) kombinasyonunun bu parametreler üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Çalışmada deney hayvanları kontrol, PKOS, metformin, EE/DRSP ve metformin+EE/DRSP olmak üzere farklı gruplara ayrılmıştır. PKOS modeli oluşturulduktan sonra serum hormon düzeyleri (FSH, LH, östradiol ve testosteron) belirlenmiş, kan ve over dokularından RNA ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi ile analiz edilirken, DNA metilasyon durumları metilasyon spesifik PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, PKOS grubunda hormonal dengenin bozulduğunu ve over dokusunda morfolojik değişikliklerin meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca *Trpv1* ve *Trpm2* genlerinin ekspresyon düzeylerinde ve promotör metilasyon durumlarında önemli değişiklikler tespit edilmiştir. Uygulanan metformin ve EE/DRSP tedavilerinin hem gen ekspresyonu hem de metilasyon profilleri üzerinde düzenleyici etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle kombine tedavi uygulamasının bazı parametrelerde daha belirgin iyileşme sağladığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının PKOS patogenezinde rol oynayabileceğini ve epigenetik düzenlemeler ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, PKOS'un moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamakta ve bu iyon kanallarının potansiyel terapötik hedefler olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA Metilasyonu, Metformin, Polikistik Over Sendromu, *Trpv1*, *Trpm2*.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biochemistry
Medical Biochemistry
[Doctoral Thesis]

THE ROLE OF EXPRESSION AND METHYLATION OF *Trpv1* AND *Trpm2* ION CHANNELS IN RAT POLYCYSTIC OVARY SYNDROME MODEL

Emine Incilay TORUNOĞLU

Konya-2026

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex endocrine and metabolic disorder commonly observed in women of reproductive age and is characterized by hyperandrogenism, ovulatory dysfunction, and polycystic ovarian morphology. The aim of this doctoral thesis was to investigate the gene expression levels and promoter methylation status of *Trpv1* and *Trpm2* ion channels in a rat model of PCOS, and to evaluate the effects of metformin and the ethinyl estradiol/drospirenone (EE/DRSP) combination, which are commonly used in the treatment of PCOS, on these parameters. In this study, experimental animals were divided into different groups as control, PCOS, metformin, EE/DRSP, and metformin+EE/DRSP treatment groups. After the establishment of the PCOS model, serum hormone levels including follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, and testosterone were determined. RNA and DNA were isolated from blood and ovarian tissues. Gene expression levels were analyzed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), while DNA methylation status was evaluated by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). The results demonstrated that hormonal balance was disrupted in the PCOS group and that significant morphological alterations occurred in ovarian tissues. In addition, notable changes were observed in both the expression levels and promoter methylation status of the *Trpv1* and *Trpm2* genes. Treatment with metformin and EE/DRSP showed regulatory effects on both gene expression and methylation profiles. In particular, the combined treatment exhibited more pronounced improvements in several parameters. In conclusion, the findings of this study suggest that *Trpv1* and *Trpm2* ion channels may play a role in the pathogenesis of PCOS and may be associated with epigenetic regulatory mechanisms. These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying PCOS and indicate that these ion channels may represent potential therapeutic targets for the management of the disorder.

Keywords: DNA Methylation, Metformin, Polycystic Ovary Syndrome, *Trpv1*, *Trpm2*.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Tezin Konusu ve Özgün Değeri

Araştırmamızın konusu, ratlarda oluşturulan Polikistik Over Sendromu (PKOS) modelinde *Trpv1* (Transient receptor potential channels, vanilloid subtype-1) ve *Trpm2* (transient receptor potential melastatin-2) iyon kanallarının gen ekspresyonları ile metilasyonunun PKOS patogeneziindeki rolünü ve PKOS tedavisinde yaygın olarak kullanılan Metformin, Drospirenone/Ethinylestradiol (EE/DRSP) kombine kullanımlarının etkisini araştırmaktır.

Bu çalışma, PKOS patogenezi ve tedavi mekanizmalarının anlaşılmasında önemli sonuçlar ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir. *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının PKOS üzerindeki etkisi üzerine odaklanması bu çalışmanın önemini artırmaktadır. *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanalları, PKOS' un gelişiminde ve ilerlemesinde kritik roller oynayan moleküler bileşenlerdir. *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin ve genetik metilasyonun PKOS patogeneziindeki önemli faktörler olduğu bu çalışma ile ortaya konabilecektir. Elde edilecek bulguların, PKOS semptomlarının tedavisi ve üreme fonksiyonlarının iyileştirilmesine yönelik potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Metformin ve EE/DRSP tedavide sıklıkla kullanılan ilaçların *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarını nasıl etkilediğini araştıran bu çalışma, PKOS tedavisindeki farmakolojik yaklaşımların etkinliğini daha iyi anlamamıza katkı sağlayabilir. Bu da PKOS yönetiminde yeni ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açabilir. Bu çalışmanın, *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının PKOS patogeneziindeki rolünü ve tedavi sürecindeki etkilerini ortaya koyarak hastalığın mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına ve daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlaması hedeflenmektedir.

1.2. Amaç ve Hedefler

Araştırmamızın amacı ratlarda oluşturacağımız PKOS modelinde *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının gen ekspresyonları ile metilasyonunun rolünü ve PKOS tedavisinde yaygın olarak kullanılan Metformin, EE/DRSP ilaçlarının etkisini araştırmaktır. Bu çalışmanın beklenen yararları ve uygulamaya aktarma potansiyeli şunları içermektedir:

1.2.1. PKOS patogenezinde iyon kanallarının rolü ve öneminin aydınlatılması

Trpv1/Trpm2 iyon kanalları ile PKOS arasındaki olası ilişkiyi açıklığa kavuşturmayı amaçlamaktadır. PKOS, birçok ciddi metabolik komplikasyon ile ilişkilendirilmiştir. Bu komplikasyonlar arasında tip 2 diyabet, metabolik sendrom gibi durumlar bulunmaktadır. *Trpm2* ve *Trpv1* kanalları, metabolik denge ve insülin salınımı gibi önemli işlevleri düzenleyen proteinlerdir. Metforminin *Trpm2* kanal aktivitesini inhibe ederek insülin salınımını artırdığı ve glukoz metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir. İyon kanallarının PKOS patogenezindeki rolünün ve öneminin araştırılması, bu sendromun gelişimi ve ilerlemesinde potansiyel katkıları aydınlatmayı hedeflemektedir. Bu araştırma, PKOS'un altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamamıza ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açabilir.

1.2.2. Tedavide kullanılan ajanların iyon kanalları üzerinden olası etkilerinin aydınlatılması

PKOS tedavisinde hormonal ilaçlar (oral kontraseptifler), anti-androjenler ve insülin duyarlılığını artıran ilaçlar (metformin vb.) gibi seçenekler bulunmaktadır. Bu tedavi ajanlarının iyon kanalları üzerindeki olası etkilerinin aydınlatılması, PKOS'un patogenezi ve tedavisi açısından önemli bir alan olabilir ve gelecekte daha iyi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

1.2.3. Semptomların tedavisi ve üreme fonksiyonlarının iyileştirilmesi

Araştırma sonuçlarımız, *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının PKOS'un semptomları üzerindeki etkisini ortaya koyacak ve semptomların daha iyi yönetilmesine ve üreme fonksiyonlarının iyileştirilmesine yönelik yenilikçi terapötik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabileceğine sahiptir.

1.2.4. PKOS tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi

Araştırmamızın sonuçları öncelikle PKOS patogenezinin aydınlatılmasına ışık tutacaktır ve PKOS tedavisinde sıklıkla kullanılan Metformin, EE/DRSP ve bunların kombinasyonlarının *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanalları üzerindeki etkisini aydınlatacaktır. Dolayısıyla daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

1.2.5. Ekonomiye katkı

PKOS, kadınlarda yaygın bir hormonal bozukluktur ve tıbbi tedavi gerektirmektedir. Araştırma sonuçlarımız, daha etkili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ve hastaların yaşam

kalitesini artırmaya yönelik maliyet-etkin yaklaşımların benimsenmesine katkıda bulunacaktır.

1.2.6. Yayınlar ve bilimsel katkı

Çalışmamızın sonuçları, bilimsel alanda literatüre katkı sağlayacak potansiyele sahiptir. Bu konuya ilgi duyan araştırmacılar ve sağlık profesyonelleri tarafından ileri araştırmalara ışık tutacaktır. Bulgularımızın ulusal ve uluslararası makale olarak sunulması planlanmıştır. Yayınlanan makaleler, PKOS üzerine yapılan araştırmalara yeni bir perspektif sunabilir ve gelecekteki çalışmaların temelini oluşturabilecektir.

1.2.7. Sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesi

Araştırmanın sonuçları, PKOS hastalarının mevcut tedavi protokollerinin değerlendirilmesine ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu da hastalara daha iyi sağlık hizmeti sunulmasını sağlayacaktır.

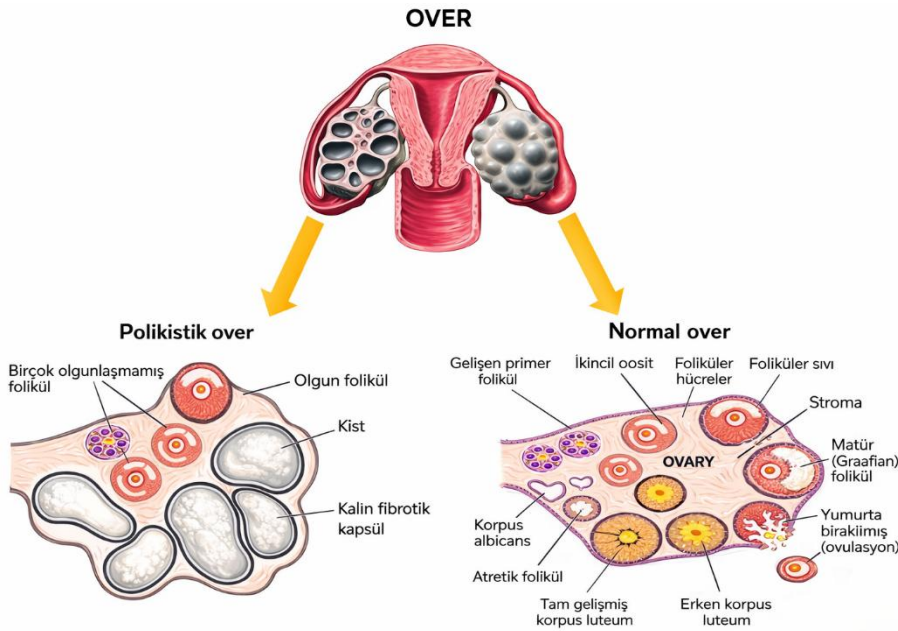
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polikistik Over Sendromu

2.1.1. Tanım

Polikistik over sendromu (PKOS), artmış androjen düzeyleri, menstrüasyon bozuklukları ve polikistik overlerle karakterize karmaşık bir hormonal bozukluktur (Teede ve ark., 2023). Literatürde bir “hastalık” olarak değil, çoklu semptomlarla seyreden bir “klinik tablo” olarak değerlendirilmektedir (Mohammed ve ark., 2025).

Uluslararası Kanıta Dayalı PKOS Değerlendirilmesi ve Yönetimi Kılavuzu’na göre, yetişkinlerde PKOS tanısı için aşağıdaki üç kriterden en az ikisinin bulunması gerekmektedir (Teede ve ark., 2023). (1) Total testosteron, serbest androjen indeksi veya biyolojik olarak kullanılabilir testosteronun artışıyla birlikte klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm; (2) düzensiz veya hiç adet görmeme ile birlikte ovulatuvar disfonksiyon; (3) çok sayıda küçük antral folikül, genişlemiş overler ve/veya artmış anti-müllerian hormon (AMH) düzeyleri ile karakterize PKO morfolojisi. Polikistik overler ile normal over hücrelerinin karşılaştırılması şekil 2.1. gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Polikistik overler ile normal over hücrelerinin karşılaştırılması (Teede ve ark., 2023).

2.1.2. Tarihçesi

PKOS, ilk kez 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal tarafından yapılan araştırmalar sonucunda, yumurtlama bozukluklarıyla ilişkili bir klinik tablo olarak tanımlanmıştır. Modern tarihçesi, 1935 yılında Irving F. Stein ile Michael L. Leventhal

tarafından “amenore, hirsutizm ve poli-kistik over görünümü” üçlüsü bağlamında tanımlandığında başlamış olup, bu çalışmayla sendrom ilk kez sistematik biçimde tarif edilmiştir (Stein ve Leventhal, 1935). Bununla birlikte, tarihi kayıtlar incelendiğinde 1721’de İtalyan bilim insanı Antonio Vallisneri tarafından “parmak yumruğu büyüklüğünde parlak, beyaz yüzeyle yumurtalıklar” tanımlanmış ve bu bulgu günümüzde PKOS ile ilişkilendirilmektedir (Azziz, 2021). Tanı kriterleri, 1990’lı yıllarda National Institutes of Health (NIH) tarafından önerilmiş (A. Huang ve ark., 2010) ve daha sonra 2003 yılında European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine (Geisthövel, 2003) ortaklaşa belirlediği “Rotterdam kriterleri” ile yaygın biçimde kabul görmüştür.

2.1.3. Epidemiyolojisi

Prevalans

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sınıf II oligoovülasyon tanısı almış 827 kadın üzerinde yürütülen çalışmada, olguların %55’inin 1990 Ulusal Sağlık Enstitüleri kriterlerine, %91’inin ise 2003 Rotterdam kriterlerine göre polikistik over sendromu (PKOS) kapsamında değerlendirildiği bildirilmiştir. Bu bulgu, Rotterdam kriterlerinin daha geniş ve kapsayıcı tanı ölçütleri sunduğunu ve buna bağlı olarak PKOS prevalansının anlamlı düzeyde daha yüksek saptandığını göstermektedir. Bu bulgu, Rotterdam kriterlerinin daha geniş kapsamlı tanı ölçütleri sunduğunu ve dolayısıyla prevalans değerlerini anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir (Broekmans ve ark., 2006). 2012 yılında Türkiye’de 392 kadın üzerinde gerçekleştirilen epidemiyolojik bir çalışmada, PKOS prevalansı; Ulusal Sağlık Enstitüleri (1990), Rotterdam (2003) ve Androjen Fazlalığı ve PKOS Derneği kriterlerine göre sırasıyla %6,1, %19,9 ve %15,3 olarak saptanmıştır. Bu bulgular, PKOS tanısında kullanılan kriter setlerinin epidemiyolojik prevalans tahminleri üzerinde belirleyici bir rol oynadığını ortaya koymakta; ayrıca sendromun hem üreme sağlığı hem de metabolik hastalıkların gelişimi açısından önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu açıkça göstermektedir (Yildiz ve ark., 2012). Türkiye’de 2020 yılında yayımlanan bir meta-analizde PKOS prevalansı %15 - 20 aralığında bildirilmiştir (Deswal ve ark., 2020).

Komorbiditeler

PKOS ve obezite, birbirini etkileyen karmaşık patofizyolojik süreçlerdir. PKOS’lu kadınların yaklaşık %65’inde obezite varlığı bildirilmiş olup, bu durumun hem genetik yatkınlık hem de çevresel faktörlerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Obezitenin

değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan klinik ölçütler arasında vücut kitle indeksi (VKİ), bel çevresi ve bel–kalça oranı yer almaktadır (Hagberg & Spalding, 2023).

Puberteden yetişkinliğe geçiş sürecinde kilo artışının belirgin olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda, PKOS’lu bireylerin %11’inde yüksek vücut kitle indeksi (VKİ) eğilimi saptanırken, PKOS bulunmayan kontrol grubunda bu oran %6,6 olarak bildirilmiştir. On yıllık izlem süresinde ise PKOS’lu bireylerin ortalama olarak +2,6 kg daha fazla kilo artışı gösterdiği rapor edilmiştir (Stener-Victorin ve ark., 2024). Bununla birlikte, menopoz dönemine yaklaşıldıkça bu farkın azaldığı, PKOS’u olmayan kadınların da zamanla benzer şekilde kilo aldığı ifade edilmektedir. Ayrıca, PKOS ile ilişkili kilo artışının etnik kökene göre farklılık gösterdiği; Amerikalı Hispanikler, Afrikalı Amerikalılar ve Güney Pasifik Adalıların daha yüksek vücut ağırlığına sahip olduğu, buna karşın Avrupalılar ile Güney ve Doğu Asyalı bireylerin daha düşük VKİ değerlerine rağmen daha yüksek abdominal obezite oranları sergilediği bildirilmektedir (Sendur ve Yildiz, 2021).

Abdominal obezite, insülin direnci ve hiperinsülinemi ile ilişkili olup, artmış lipoliz sonucunda dokularda serbest yağ asitlerinin birikimine yol açar; bu durum lipotoksisite aracılığıyla hücrel hasarı artırarak insülin direncinin progresyonuna katkıda bulunur. Artan insülin direnci ve hiperinsülinemi, ovulasyon sürecini olumsuz etkileyerek menstrüel düzensizliklere ve doğurganlığın azalmasına neden olabilir (Cena ve ark., 2020).

Epidemiyolojik veriler, PKOS’lu kadınların %40–80’inde hiperandrojenizmin görüldüğünü göstermektedir. Hiperandrojenizmin klinik belirtileri etnik köken, obezite ve yaşa göre değişkenlik göstermektedir. Hirsutizm, PKOS’lu hastaların yaklaşık %70–80’inde gözlenirken, genel popülasyonda bu oran ortalama %13’tür (aralık %8–20) ve bölgesel farklılıklar mevcuttur (Mousa ve ark., 2023). Akne görülme sıklığı PKOS’lu bireylerde yaklaşık %43’tür (%95 GA: %41–45) ve PKOS’u olmayan bireylerde %21’dir (95% GA: %19–22). Akne oranı, yetişkinlere kıyasla ergenlerde ve hiperandrojenik PKOS alt tipinde daha yüksektir (Ramezani Tehrani ve ark., 2021). Kadın tipi androjenetik alopesi PKOS’lu kadınlarda yaklaşık %28 oranında (95% GA: %22–34) görülmektedir (Carmina ve ark., 2019).

Bu klinik belirtilerin, hastalarda ciddi psikolojik sıkıntılara yol açtığı bilinmektedir. Dolayısıyla, sendromun yönetiminde yalnızca hormonal dengenin değil, psikolojik sağlığın da bütüncül şekilde ele alınması gerekmektedir (Karjula ve ark., 2017).

PKOS olan kadınlarda infertilite riski, PKOS'u olmayan kadınlara göre yaklaşık 15 kat daha fazladır (Joham ve ark., 2015). PKOS'lu kadınlarda kendiliğinden ovulasyon meydana gelebilir, bu nedenle gebelik istenmiyorsa uygun bir doğum kontrol yöntemi kullanılmalıdır. Yaklaşık 35–40 yaşına gelen PKOS'lu kadınlarda adet döngüleri düzenli hale gelebilir ve ovulasyon yeniden ortaya çıkabilir; ancak bu durumun ileri yaşlardaki doğurganlık üzerindeki etkileri hâlâ belirsizdir.

PKOS, maternal gebelik ve doğum komplikasyonları açısından artmış bir risk ile ilişkilidir. Ancak, PKOS'un klinik özelliklerinin ve diğer potansiyel risk faktörlerinin bu komplikasyonlar üzerindeki etkisi hâlâ tam olarak bilinmemektedir (Bahri Khomami ve ark., 2019).

2.1.4. Etiyolojisi

PKOS'un etiyolojisi bilinmemektedir. Hastalık bazen kalıtsal olabilir. Aile bireylerinizden herhangi birinde PKOS varsa, PKOS olabilme riskiniz artabilir. PKOS yalnızca hormonal bir bozukluktan ibaret olmadığını, aksine genetik yatkınlık, epigenetik düzenlemeler, çevresel faktörler ve metabolik değişimlerin dinamik etkileşimi sonucunda geliştiğini göstermektedir (Azziz ve ark., 2016). Genetik faktörler, PKOS'a yatkın bireylerde androjen üretimi, gonadotropin salınımı ve insülin duyarlılığını düzenleyen genlerdeki varyasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Fetal dönemde meydana gelen epigenetik değişikliklerin, özellikle maternal hiperandrojenemi ve gestasyonel metabolik dengesizlikler gibi intrauterin faktörlerin etkisiyle, ilerleyen yaşlarda polikistik over sendromu (PKOS) gelişimine zemin hazırlayabileceği bildirilmektedir. Bunun yanı sıra, bisfenol A ve ftalatlar gibi çevresel endokrin bozuculara maruziyetin hormonal sinyal yollarını etkileyerek ovaryan fonksiyonlarda bozulmaya yol açabileceği öne sürülmektedir.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, PKOS'un etiyolojisinin tek bir mekanizmayla açıklanamayacağı; aksine genetik, epigenetik, çevresel, hormonal ve metabolik etkenlerin birbirini etkileyerek ilerleyen çok boyutlu bir patofizyolojik süreç olduğu anlaşılmaktadır.

2.1.5. Gelişimi

Hormon dengesizlikleri, artmış androjen seviyeleri, bozulmuş gonadotropin salgısı ve insülin direnci ile karakterize olan PKOS patogenezinin merkezinde yer alır. Hiperandrojenizm, düzensiz adet döngülerine neden olur ve hirsutizm ile akne gibi PKOS'un

karakteristik belirtilerine katkıda bulunur. Hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) düzensiz salınımı, PKOS'un temel bir özelliğidir; adet döngüsünü bozar ve amenoreye neden olur (Roberts ve ark., 2020). Hormon dengesizliği, yumurtalığın antral foliküllerinde kistlerin oluşumuna neden olur; bu durum ovulasyonu engeller ve adet döngüsünü bozarak amenoreye yol açar. PKOS'ta kistik yapıların yaklaşık 10 mm çapa ulaşabildiği ve over hacminde 10 cm'ye varan genişlemelerin görülebildiği; bu morfolojik değişikliklerin ovulasyonu bozarak fertilizasyon sürecini olumsuz etkilediği ve gebelik oluşumunu zorlaştırdığı bildirilmektedir (Hajam ve ark., 2024). PKOS, gestasyonel diyabet ve gebeliğe bağlı hipertansiyon gibi gebelikle ilişkili sorunlarla bağlantılıdır (McDonnell ve Hart, 2017). Gelişen folikülleri destekleyen teka hücreleri, PKOS hastalarında insüline aşırı duyarlılık gösterir ve bu da androjen seviyelerinin yükselmesine yol açar.

PKOS, seks hormonlarındaki dengesizlikle karakterize olup yumurtalıklarda kist oluşumuna yol açar. Artmış luteinize edici hormon (LH) düzeyleri ve azalmış folikül uyarıcı hormon (FSH) düzeyleri, LH/FSH oranının yükselmesine neden olur ve bu durum genellikle PKOS'lu kadınlarda anormal vücut kitle indeksi (BMI) ile ilişkilidir. Yumurtalık içinde aşırı androjen salgılanması, hiperinsülinemi ve değişmiş steroidogenez nedeniyle PKOS gelişiminde önemli bir faktördür. PKOS'ta normal bireylere göre daha fazla gelişmekte olan folikül bulunur ve folikül olgunlaşmasını düzenleyen çeşitli faktörler arasındaki dinamikler hâlâ tam olarak açıklanamamıştır. PKOS, bozulmuş foliküler gelişim, anormal morfoloji ve yumurtalıklarda düzen bozukluğu ile ilişkilidir (Franks ve ark., 2008).

2.1.6. Patogenezi

Hiperandrojenizm genellikle seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) düzeylerinde azalmaya ve serbest testosteron konsantrasyonunda artışa yol açar. PKOS'lu kadınlarda plazmadaki artmış testosteron seviyeleri, yağ dokusunda östrona dönüştürülebilir. Östronun E2'e dönüşümündeki bozulmalar, folikül büyümesini etkiler ve LH ile FSH oranını bozarak ovulatuvar disfonksiyona neden olur (Y. Li, Chen ve ark., 2019). Hiperandrojenizm aynı zamanda anti-müllerian hormon konsantrasyonlarını artırarak çeşitli mekanizmalar aracılığıyla ovulasyonu ve folikül gelişimini baskılar. Buna ek olarak, folliküler sıvıda follikül çapını ve E2 konsantrasyonunu pozitif yönde etkileyen insülin benzeri büyüme faktörü-II konsantrasyonları, androjen ile ters orantılıdır; Hiperandrojenizm, folliküler sıvıdaki androjen konsantrasyonunun azalması ile ilişkilendirilmektedir (Y. Li, Zheng ve ark., 2019). Hiperandrojenizm dolaylı olarak LH konsantrasyonlarını artırır (Moore ve Campbell, 2017).

Hem E2 hem de progesteron, negatif geri bildirim mekanizmaları aracılığıyla GnRH ve LH salgısını kontrol eder (Coyle ve Campbell, 2019; Ruddenklau ve Campbell, 2019). Hiperandrojenizm bu negatif geri bildirimi bozar ve LH düzeylerinin artmasına neden olur (Ruddenklau ve Campbell, 2019).

Hiperandrojenizm, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla insülin duyarlılığını ve GLUT-4 ekspresyonunu azaltmakta, ayrıca hepatositlerde insülin yıkımını baskılayarak insülin direncini şiddetlendirmektedir (J. Wang ve ark., 2019). İnsülin direnci sonucunda gelişen hiperinsülinemi, LH ile ovaryum teka hücrelerinde androjen sentezini uyarır. Artan androjen düzeyleri, insülinle etkileşerek SHBG konsantrasyonlarını azaltır ve serbest androjen miktarının yükselmesine neden olur. Bu durum hirsutizm gibi klinik belirtilerle kendini gösterebilir (Ding ve ark., 2021).

PKOS patogenezinde, hipotalamus-hipofiz-ovaryan eksenindeki hormonal dengesizlikler önemli rol oynamaktadır. Hipofiz bezinden salgılanan LH ve FSH, ovulasyonu düzenleyen hormonlardır. Menstrual döngünün başlangıcında LH ve FSH seviyeleri hemen hemen aynıdır. Ancak ovulasyonun başlamasına saatler kala LH seviyesi yükselir ancak salgılandıktan sonra normale döner. Dişilerde fizyolojik olarak düşük düzeylerde bulunan testosteron konsantrasyonlarının artması, ovulatuvar fonksiyonları ve menstrual siklus düzenini inhibe edebilmektedir. Buna karşın, E2, menstrual siklusun regülasyonu, ovulasyonun gerçekleşmesi ve fertilitenin sürdürülmesinde kritik rol oynayan temel bir östrojenik hormondur. Menstrual siklusun başlangıcında E2 konsantrasyonları düşüktür, daha sonra kademeli olarak yükselmeye başlar ve yumurtlamadan önceki günlerde artarak yükselir. PKOS patogenezinde, hipotalamik GnRH salınımının artan sıklığına cevaben artmış LH/FSH oranı hakimdir ve bu durum androjen artışına, overyan teka hücrelerinin aşırı uyarılması yoluyla over foliküllerinin üretimini ve olgunlaşmasının azalmasına neden olmaktadır (Szeliga ve ark., 2022). PKOS mekanizması karmaşık bir hormonal ve metabolik dengesizlikler ağıyla ilişkilidir ve bu durumun nedeni tam olarak anlaşılamamıştır; ancak genetik ve çevresel faktörlerin bir araya gelerek hastalığı tetikleyebileceği düşünülmektedir.

PKOS'un nöroendokrin bir temele sahip olabileceğini ve bipolar bozukluk ile epilepsi gibi psikiyatrik rahatsızlıkları bulunan kadınların bu sendromu geliştirmeye daha yatkın olduklarını göstermektedir (Qadri ve ark., 2018). Valproat gibi ilaçlar tarafından modüle edilebilen değişmiş GABA aktivitesi ve düzeylerinin, hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı üzerinde etkili olarak PKOS gelişimine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Ghodke-

Puranik ve ark., 2013; Viswanathan ve ark., 2016; L. Zhang ve ark., 2016). Bu bulgular, PKOS'un başlangıcında nöroendokrin eksenin potansiyel rolünü vurgulamaktadır.

Hem hipofiz gonadotrop hücreleri hem de beyindeki GnRH salınımı, LH amplitüdünü düzenleme kapasitesine sahiptir. Her iki dokuda meydana gelen değişiklikler, LH atım genliği ve bazal LH düzeylerindeki farklılıklarda rol oynayabilir. GnRH pulsatif salınımının zamanlaması, LH puls frekansını belirleyen temel düzenleyici mekanizmayı oluşturmakta olup, bu süreç hem GnRH nöronlarındaki intrinsik değişikliklerden hem de upstream konumda yer alan GnRH puls jeneratöründeki nöroendokrin modifikasyonlardan etkilenebilmektedir (Condorelli ve ark., 2017).

Adipoz doku, sistemik glukoz metabolizması ve insülin duyarlılığında merkezi bir rol oynar. Vücut kitle indeksi kontrol PKOS' u olmayan kadınlarla karşılaştırıldığında, PKOS'lu kadınlarda sistemik yağ birikimi ve belirgin şekilde artmış subkutan yağ hücresi hacmi gözlenmiştir (Kokosar ve ark., 2018; Polak ve ark., 2020; ve Zhu ark., 2021). Adipoz dokuda gelişen insülin direnci, glukoz alımını ve lipid birikimini azaltır, aynı zamanda lipid yıkımını önemli ölçüde inhibe eder. Bu durum, aşırı serbest yağ asitlerinin iskelet kası ve karaciğere taşınmasına, burada yağ depolanmasına ve iskelet kası ile karaciğerdeki insülin direncinin şiddetlenmesine yol açar (Zhao ve ark., 2023).

2.2. Polikistik Over Sendromu Medikal Tedavi Yaklaşımları

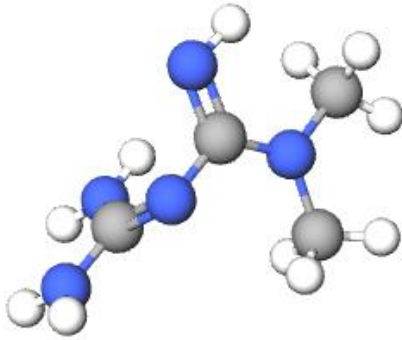
PKOS tedavisi, farmakolojik ve non-farmakolojik yaklaşımları içeren multimodal bir terapötik stratejiye dayanmaktadır. Farmakolojik olmayan tedaviler arasında yaşam tarzı değişiklikleri, psikolojik danışmanlık ve cerrahi müdahaleler yer alır (Pundir ve ark., 2019). Bu tedaviler, PKOS'un çok disiplinli ve kişiye özel yönetiminde önemli bir rol oynar. Farmakolojik müdahaleler arasında ise oral kontraseptifler, metformin, anti-androjenler, tiazolidindionlar, glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri, insülin duyarlılığını artırıcı ajanlar, aromataz inhibitörleri ve antioksidanlar yer alır. Bu ilaçlar, PKOS ile ilişkili ovulasyon bozuklukları ve infertilite tedavisinde etkilidir (Della Corte ve ark., 2020; Magzoub ve ark., 2022; Turcpar ve ark., 2013).

2.2.1. Metformin

Metformin'in kullanım alanları

Tip 2 diyabet tedavisinde onaylanmış bir biguanid olan metformin, obez, fazla kilolu veya metabolik bozuklukları bulunan PKOS'lu hastaların tedavisinde en yaygın olarak

araştırılan ve en sık uygulanan insülin duyarlılaştırıcı ajandır (Şekil 2.2) (C. C. Huang ve ark., 2023). Biguanidlerin en potansiyel olarak ölümcül klinik etkisi laktik asidozdur. Biguanid ilişkili laktik asidozun görülme sıklığı düşük olmasına rağmen, mortalite oranının %30–50 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Metformin kaynaklı laktik asidoz gelişiminde temel risk faktörü böbrek fonksiyon bozukluğudur (Attia ve ark., 2023). PKOS tedavisi için kullanıldığında, LH ve androjen seviyelerini azaltma ve döngünün düzenlenmesine yardımcı olur (Rashid ve ark., 2023). Metforminin yalnızca endokrinolojik bozuklukları düzeltmekle kalmayıp, aynı zamanda ovaryum disfonksiyonunu iyileştirir ve obez PKOS hastalarında vücut ağırlığını azaltabildiğini ortaya koymuştur (Guan ve ark., 2020). Metformin, PKOS olan kadınlarda endotel fonksiyonunu iyileştirdiğini ve endotel disfonksiyonunu azalttığı bildirilmiştir (Heidari ve ark., 2019).



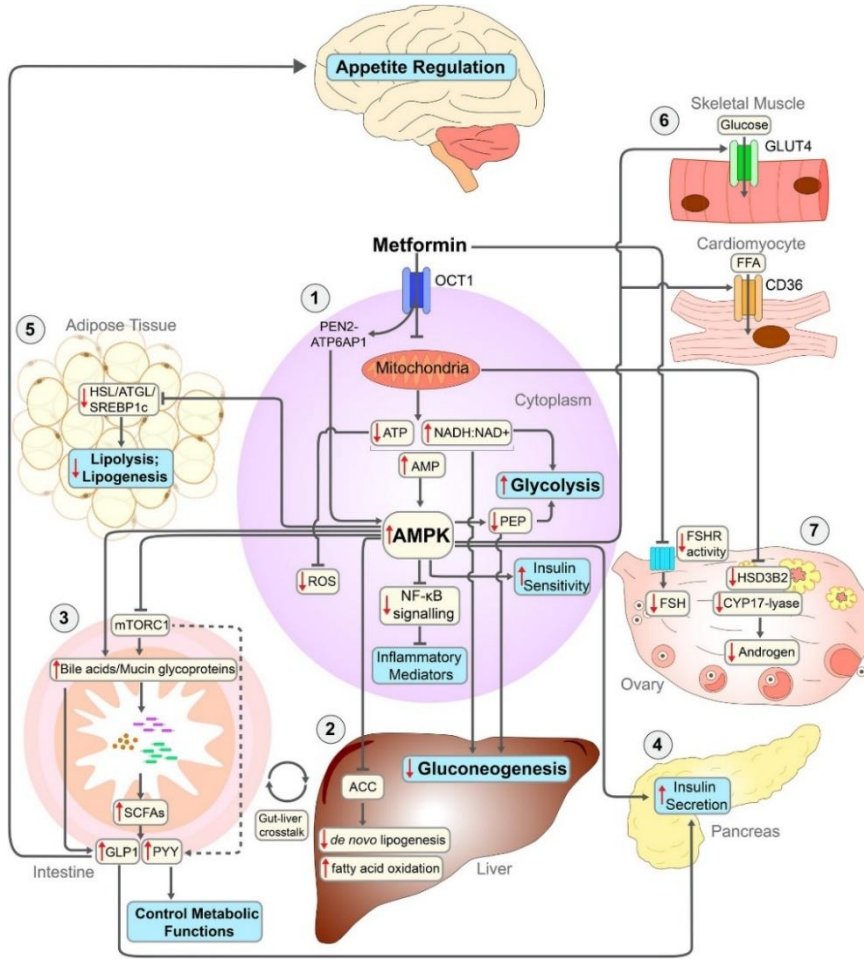
Şekil 2.2. Metformin kimyasal yapısı (<https://molview.org/>).

Metformin'in PKOS'taki etki mekanizması

Metformin kullanımı, PKOS'lu kadınlarda ovülasyonun gerçekleşmesi ve menstrüel siklusun düzenlenmesiyle ilişkilidir (Shpakov ve Sechenov, 2021). İlacın temel klinik işlevi, metformin insülin salınımını artırmaz; antidiyabetik etkilerini mitokondriyal kompleks I'ı inhibe ederek ve insülin duyarlılığını artırarak gösterir; ayrıca hepatik glukoz alımını azaltır, periferik glukoz absorpsiyonunu artırır, bağırsak glukoz tüketimini yükseltir ve yağ asidi oksidasyonunu azaltır (Mehrpour ve ark., 2022; Szymczak-Pajor ve ark., 2022). Metformin ayrıca açlık serum insülin düzeyini yaklaşık %40 oranında düşürür (bu nedenle hipoglisemi riski oldukça düşüktür) ve ortalama vücut ağırlığında %5,8 oranında azalma sağlar (Attia ve ark., 2023).

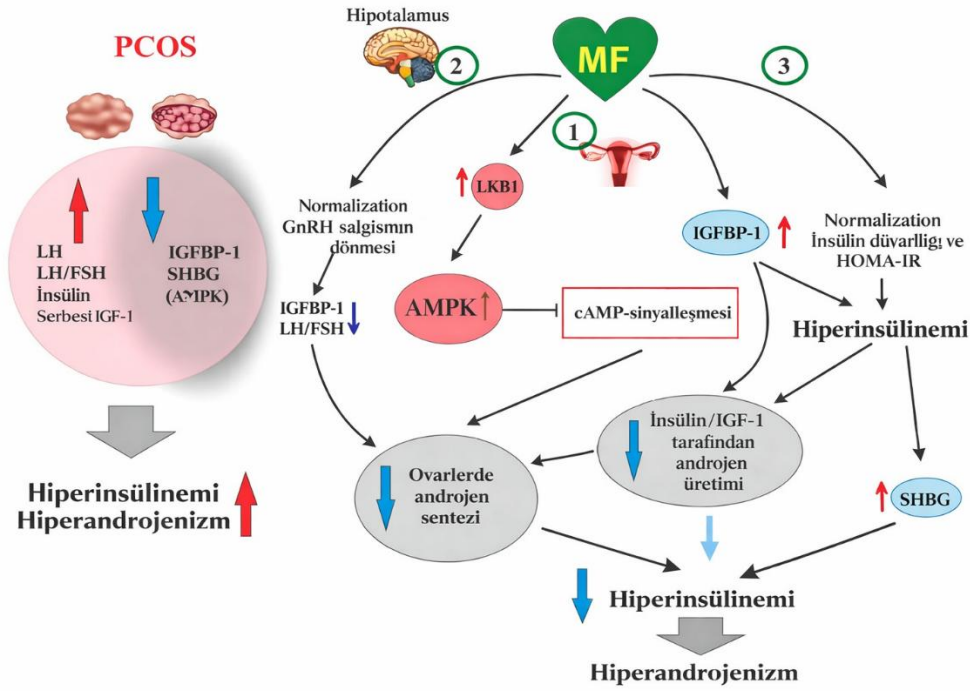
Metformin hücre sel solunuma müdahale ederek mitokondriyal solunum zinciri kompleks I' i inhibe eder mitokondriyal stres oluşturur ve hücre içi ATP seviyesini düşürerek hücrede açlık durumunu taklit eder. Bu durum, adenozin monofosfat (AMP) havuzunun artmasına neden olur ve hücre enerji sensörü olan AMP ile aktive edilen protein kinazı (AMPK) etkinleştirir. AMPK, doğrudan AMP moleküllerinin enzimin gama alt birimine bağlanmasıyla ya da dolaylı olarak defosforilasyonunun engellenmesi yoluyla aktive edilir. AMPK aktivasyonu, glukoz taşıyıcılarının (GLUT) hücre zarına taşınmasını artırır ve hücre içine glukoz girişini hızlandırarak glukoz kullanımını artırır (Hardie, 2008; Hardie ve ark., 2016; Lin ve Hardie, 2018).

Adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) aktivasyonu aynı zamanda asetil-CoA karboksilaz (ACC) aktivitesinde azalmaya yol açar; bu durum, yağ asitlerinin oksidasyonunu azaltır ve lipojenik enzimleri baskılar. Yağ asidi oksidasyonunun baskılanması, hipetrigliseridemi düzeylerinde azalmaya neden olarak glukoneogenez için enerji kullanımını sınırlar. Bu durum, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) temizlenmesinin artması ve sentezinin azalmasıyla ilişkilidir. Lipoliz inhibisyonu ve trigliserid düzeylerindeki azalma, lipotoksisitenin düşmesi yoluyla insülin duyarlılığının artmasına yol açar (Attia ve ark., 2023).



Şekil 2.3. Metforminin hüresel etki mekanizmaları (Shpakov ve Sechenov, 2021).

Metformin yumurtalıklardaki steroidojenik aktivite üzerindeki inhibitör etkisinin mekanizmalarının çözülmesinde, AMPK'nın uyarılması ve yumurtalık hücrelerinde AMPK'ya bağımlı yolların tetiklenmesi kilit bir rol oynamaktadır. Yumurtalık hücrelerinde AMPK aktivasyonu mekanizmaları, şekil 2.3. ve 2.4. Shpakov ve Sechenov, (2021) açıklanan mekanizmalarla benzer olup, mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I'inde metforminin neden olduğu elektron taşıma zinciri inhibisyonu ile tetiklenmektedir (Du ve ark., 2022). İnsanlar, diğer memeliler ve kuşlarda (sıçan ve fare) AMPK'nın oosit-kumulus kompleksleri, granüloza ve theka hücreleri ile korpus luteum dâhil olmak üzere eksprese edildiği bilinmektedir (W. Yang ve ark., 2020).



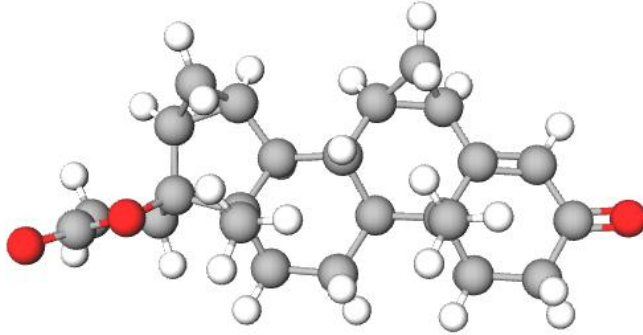
Şekil 2.4. PKOS'ta metforminin hiperandrojenizm üzerindeki inhibitör etkisi (Krattenmacher, 2000).

2.2.2. Kombine oral kontraseptifler

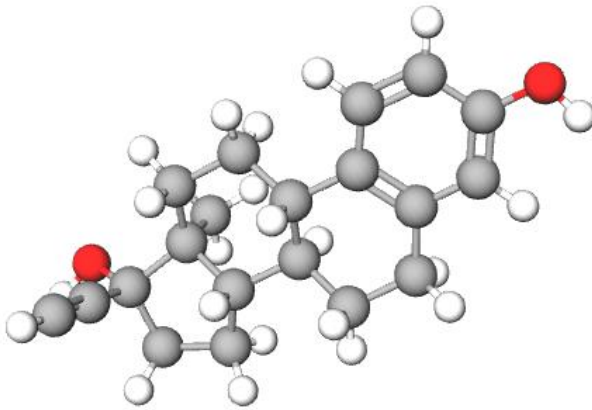
Günümüzde PKOS tedavisinde etkili bir yöntemdir (Forslund ve ark., 2023). Etinilöstradiol (EE) içeren dördüncü nesil kombine oral kontraseptiflerin, yenilikçi bir progestin olan drospirenon (DRSP) ile kullanımı, anti-mineralokortikoid ve antiandrojenik aktiviteler dahil olmak üzere doğal progesteron özelliklerine yakın etkilere sahip olduğu öne sürülmektedir. Drospirenon/etinilöstradiol (EE/DRSP) tabletlerinin progestin bileşeni, güçlü progesteron benzeri, tuz-kortikosteroid dirençli ve anti-androjen farmakolojik aktiviteye sahip steroid 17α -spironolakton türevidir (Şekil 2.5 ve 2.6) (Krattenmacher, 2000).

EE/DRSP kombinasyonu, PKOS tedavisinde kullanılan doğum kontrol ilaçlarından biridir (Y. Fu ve ark., 2024). Drospirenon'un bir spironolakton ve aldosteron antagonisti analogu olduğu ve yeni bir progestin olarak klinik geliştirme sürecinde olduğu belirtilmiştir (Paton, 2020). EE/DRSP ilaç kombinasyonunun gebeliği önlemek için kullanılan bir östrojen olan EE ile bir progestin olan DRSP içerdiğini ve antiandrojenik özelliklere sahip olduğunu ileri sürmüştür (L. Li ve ark., 2020). Bu kombine oral kontraseptiflerin klinik uygulamaya girişi hızlı olmuştur; ancak PKOS'lu adolesanlar ve genç kadınlarda etkileri henüz bilinmemektedir. PKOS tedavisinde kullanılan EE/DRSP ilaç kombinasyonu, beden kitle indeksini, glukoz ve lipid metabolizmasını, menstrüasyon siklus, sex hormonlarını düzenlemekte, ovulasyonu baskılamaktadır (Park Chun, 2019). Kombine oral kontraseptifler, hipotalamus-hipofiz ekseninin östrojen/progestojen ile etkin bir şekilde baskılanmasını

sağlayarak hormon replasman tedavisi sağlar ve böylece adet döngülerinin düzenlenmesine olanak tanımaktadır (Forslund ve ark., 2023).



Şekil 2.5. Drospirenon kimyasal yapısı (<https://molview.org/>).



Şekil 2.6. Etilnöstradiol kimyasal yapısı (<https://molview.org/>).

Kombine oral kontraseptifler, farklı mekanizmalar aracılığıyla hiperandrojenizmi azaltır. Başlıca mekanizma, testosteron için ana bağlayıcı protein olan cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) üretimini artırarak serbest dolaşımdaki androjen düzeylerini düşürmektir. Kombine oral kontraseptifler ayrıca luteinize edici hormon (LH) salgısını azaltır; bu durum, overlerden kaynaklanan androjen üretiminin azalmasına yol açar. Ek olarak, bazı progestinler, endojen androjenlerle androjen reseptörleri üzerinde rekabet ederek (örneğin cilt ve saçta) ve ciltte eksprese edilen 5- α -redüktaz tip I enzimini inhibe ederek antiandrojenik etki gösterir (Amiri ve ark., 2018). Progesteron bileşeni, pulsatil LH salgısını engelleyerek over androjen üretimini azaltabilir. Östrojen bileşeni olan EE ise karaciğerde SHBG üretimini artırarak biyolojik olarak en aktif kadın androjeni olan serbest testosteron düzeyinin düşmesine neden olur. Ayrıca, androjen reseptörlerini bloke edebilen progesteronlar

(kullanıldığında, hiperandrojenizmin tedavisindeki etkinlik artar (Min ve ark., 2022; Ruan ve ark., 2017).

2.3. İyon Kanalları

Biyolojik sistemlerde, hücreler arasındaki iletişim; hücre zarında yer alan, iyon akışına pasif olarak izin veren veya bunu aktif biçimde kontrol eden, boyut seçici filtreler ya da uyarana duyarlı moleküler valfler olarak işlev gören zar proteinleri ve iyon kanalları aracılığıyla gerçekleşir. İyon kanalları membranın lipid çift tabakasını kesen ve bu tabaka boyunca iyonların hareketini kolaylaştıran makromoleküler protein komplekslerdir (Luo ve ark., 2023).

2.3.1. Geçici reseptör potansiyel iyon kanalları

Trp kanalları, altı alt aileye ayrılmış kalsiyum geçirgen ve seçici olmayan iyon Kanallarıdır. Bu Alt Aileler; *Trpc* (“C” Kanonik), *Trpv* (“V” Vanilloid), *Trpm* (“M” Melastatin), *Trpa* (“A” ankyrin), *Trpp* (“P” polikistik) ve *Trpml* (“ML” mukolipin) olarak sınıflandırılır (Fallah ve ark., 2022). *Trp* kanallarının çoğu kalsiyum iyonuna (Ca^{2+}) geçirgendir ve TRP kanallarının aktivasyonu önemli bir Ca^{2+} giriş yoludur. Evrensel bir ikinci haberci olan hücre içi Ca^{2+} artışı, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz 2 (*CaMKK2*) sinyal yolunu aktive eder; bu yol ise iştah düzenleme merkezi olan 5' AMP-aktif protein kinaz (*AMPK*) sinyal yolunu aktive eder (T. Huang ve ark., 2023; Wu ve ark., 2018).

2.3.2. Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 (*Trpv1*) iyon kanalları

Trp melastatin kanallarının bir alt grubu ise *Trp* vanilloid 1 (*Trpv1*)’dir. Bağışıklık hücrelerinde bulunan bu kanal, acı biberlere karakteristik acılık veren inflamatuvar bir vanilloid bileşiği olan kapsaisin tarafından aktive edilir. *Trpv1*, kapsaisin tarafından aktive edilmesinin yanı sıra zararlı ısı (42 °C), düşük pH ve diğer endojen ligandlar tarafından da uyarılmaktadır. Ayrıca, iskemi/reperfüzyon kaynaklı oksidatif stres sırasında üretilen hücre dışı reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından aktive edilmekte ve potansiyalize edilmektedir (Köse ve Nazıroğlu, 2014). Ayrıca, *Trpv1*’in ağrı modülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020). *Trpv1*, homotetramerik, non-selektif bir katyon kanalıdır ve insülin salgılamasında yer alır. *Trpv1*, en iyi tanımlanmış memeli *Trp* kanalıdır. İlk olarak sıçanlardan klonlanmış, 2514 nükleotit uzunluğunda bir açık okuma çerçevesine sahip olup, 95 kDa’lık 838 amino asitlik bir protein kodlar. *Trpv1*, üç ankirin tekrar alanı içeren uzun bir N-terminal bölgeye ve S6’ya yakın bir *Trp* alanı içeren C-terminal bölgeye sahiptir (Nilius ve ark., 2007). *Trpv1* kanalı, bağışıklık hücrelerinde baharatlı yiyeceklere karakteristik acı tadını

veren inflamatuvar bir vanilloid bileşik olan kapsaisin tarafından aktive edilmektedir (Shuba, 2021; Uchida ve Izumizaki, 2021). Köse ve Nazıroğlu (2014) yaptığı çalışma, *Trpv1* kanallarının PKOS patogeneğinde rol oynayabileceği ileri sürmektedir. Bu hipotezi desteklemek için, uygun hayvan modelleri ya da uygun klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu kanallar PKOS tedavisinde potansiyel hedefler olabilirler.

2.3.3. Geçici reseptör potansiyel melastatin-2 (*Trpm2*) iyon kanalları

Geçici reseptör potansiyel vanilloid 2 (*Trpm2*), seçici olmayan katyon kanalı, çoğunlukla Ca^{2+} iyonlarına geçirgendir ve ısı, kırmızı ışık, mekanik gerilme, ROS, hormonlar ve büyüme faktörleri ve kimyasal bileşikler tarafından aktive edilebilmektedir. ROS, *Trpm2*'nin aktivatörleridir ve özellikle foliküller ve/veya korpus luteumda insan overinde rol oynarlar (Eubler ve ark., 2023).

Trpm2, inflamatuvar ve immünolojik süreçlerle ilişkilendirilmiştir çünkü makrofajlar, mast hücreleri ve adaptif bağışıklık hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilir (Nagasawa ve ark., 2007; Yamashiro ve ark., 2010). Ayrıca, kanser invazivliği ve progresyonu ile ilişkili bulunmuş ve bir biyobelirteç ile potansiyel terapötik hedef olarak önerilmiştir (Kato ve ark., 2021; Monet ve ark., 2010; Siveen ve ark., 2020).

Literatürde *Trpm2* ve gonad hücreleri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bununla birlikte, bu iyon kanalının insan testisinin çeşitli hücrelerinde, testiküler makrofajlar ve peritübüler hücreler dâhil olmak üzere yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Eubler ve ark., 2018, 2021).

Trpm2'nin kadın gonadında in situ olarak bulunduğunu ve özellikle insan granüloza hücrelerinde, endotelial hücrelerde, düz kas hücrelerinde ve makrofajlarda yer aldığını göstermiştir (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187688-TRPV2>; erişim tarihi: 19.11.2025). *Trpm2* transkript düzeylerinin folikül gelişimi ile paralel olarak insan granüloza hücrelerinde arttığını bildirilmiştir (Y. Zhang ve ark., 2018).

2.4. Epigenetik ve PKOS ilişkisi

Epigenetik, genin nükleotid dizilimini değiştirmeden gen ekspresyonunu düzenleyen bir olgudur. Epigenetik modifikasyonlar başlıca DNA metilasyonu, kromatin yeniden şekillenmesi ve kodlamayan RNA'yı içerir. Bunlar arasında DNA metilasyonu, en iyi anlaşılan ve en çok araştırılan epigenetik düzenleme mekanizmalarından biridir (Berson ve ark., 2018; Nebbioso ve ark., 2018; Rosa-Garrido ve ark., 2018). Epigenetik değişiklikler,

PKOS gelişimi ile ilişkilendirilmiştir ve bu konuda yapılan çalışmalar Olaniyi ve ark. (2022) tarafından desteklenmektedir. Kokosar ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışma, PKOS hastalarının yağ dokularında bir dizi transkripsiyonel ve epigenetik değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur.

DNA metilasyonu, S-adenozilmetiyonin (SAM) tarafından metil donörü olarak katalize edilen DNA metiltransferaz enzimi aracılığıyla sitozinin 5-metilsitozine (5mC) dönüştürüldüğü bir reaksiyondur. Memelilerde DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) esas olarak DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b enzimlerini içerir. DNMT1, metilasyon durumunun korunmasında görev alırken, non-CPG bölgelerdeki de novo metilasyon için gereklidir ve metilasyon durumunun devamlılığı ile ilişkilidir. DNMT3a ve DNMT3b ise de novo metilazlardır. DNA metilasyonu genellikle baskılayıcı bir epigenetik işaret olarak tanımlanır. DNA metilasyonu, kromatin yapısında, DNA konformasyonunda, DNA stabilitesinde ve DNA'nın proteinlerle etkileşim biçiminde değişikliklere neden olarak gen ekspresyonunu kontrol edebilir (Y. N. Liu ve ark., 2022).

Metillenmiş DNA, demetilasyon sürecine de girebilir. 5mC önce 5-hidroksimetilsitozine (5hmC) oksitlenir, ardından 5-formilsitozine (5fC) dönüştürülür ve son olarak 5-karboksisitozine (5caC) oksitlenir. Daha sonra timin DNA glikozilaz (TDG), baz eksizyon onarımı (BER) ile birlikte çalışarak DNA'daki 5fC ve 5caC'yi uzaklaştırır ve böylece yeniden modifiye edilmemiş bir sitozin (C) oluşur (Klungland ve Robertson, 2017). Birçok genin ekspresyonu DNA metilasyonu ve demetilasyonu tarafından düzenlenir. DNA metilasyonu, transkripsiyonel düzenleme, X kromozomu inaktivasyonu, embriyonik gelişim ve hücre farklılaşması gibi süreçlerde önemli rol oynar. Yapılan araştırmalar, DNA metilasyonundaki değişikliklerin tip 2 diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve PKOS gibi birçok hastalığın patogeneziyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Martín-Núñez ve ark., 2014; Oliveira ve ark., 2021; Zhong ve ark., 2021).

PKOS, karmaşık etiyolojiye ve belirli bir kalıtsal özelliğe sahip bir hastalıktır. Epigenetik, PKOS'un temel genetik fenotipini düzenleyen önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Anne karnında ya da doğum sonrası olumsuz çevresel koşullar tarafından indüklenen epigenetik değişiklikler, ergenlik döneminde PKOS benzeri semptomlara yol açabilir (Cui ve ark., 2018). Bu nedenle, anormal DNA metilasyonu da dahil olmak üzere epigenetik değişiklikler, PKOS'un gelişimine katkıda bulunabilir.

2. 5. DNA Metilasyonu ve PKOS ilişkisi

DNA metilasyonu, genellikle DNA'daki sitozin bazının pirimidin halkasındaki 5' karbonuna bir metil grubunun eklenmesiyle gerçekleşir. Bu modifikasyon çoğunlukla CpG dizilerinde yer alan sitozinlerde gerçekleşir. Bu CpG dizileri, özellikle memelilerde sıklıkla görülen bir DNA dizilim özelliğidir ve gen ekspresyonu, hücre gelişimi (Illingworth ve ark., 2008) ve transkripsiyonel düzenleme, X kromozomu inaktivasyonu, imprinting, gametogenez gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynar (Senner, 2011). DNA metilasyonunda meydana gelen değişiklikler Tip II diyabet mellitus, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (Berson, 2018, Nebbioso, 2018, Rosa-Garrido, 2018).

PKOS yalnızca üreme sistemiyle ilgili bir bozukluk olmayıp, sıklıkla metabolik anormalliklerle de birlikte görülmektedir. Metabolik anormallikler, PKOS'lu kadınların önemli bir özelliğidir ve bu anormalliklerin yol açtığı sekeller kadınların tüm yaşamlarını etkilemektedir. PKOS hastalarındaki metabolik bozukluklar başlıca hiperandrojenizm, insülin direnci ve obezite şeklinde ortaya çıkmaktadır (Patel, 2018). Bu metabolik anormalliklerin nedenleri ve mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamış olup giderek artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. PKOS'ta epigenetik modifikasyonların incelenmesi, günümüzde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. DNA metilasyonu ile hiperandrojenemi, insülin direnci ve obezite gibi anormal metabolik hastalıklar arasındaki ilişki de bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar, PKOS hastalarının overlerinde, granüloza hücrelerinde ve yağ dokularında genomik DNA metilasyonu ve transkripsiyon kalıplarında anlamlı değişiklikler bulunduğunu ve bu değişikliklerin metabolik bozukluklarla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Cui ve ark., 2018; Pan ve ark., 2018; N. Xu ve ark., 2014).

PKOS'u olan kadınlarda DNA metilasyon konsantrasyonlarını bildiren ilk çalışma 2010 yılında yayımlanmıştır. Konsantrasyonlarıiferik kandan elde edilen metilenmiş DNA'nın konsantrasyonları ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir (N. Xu ve ark., 2010). PKOS ve normal yumurtalık dokuları arasında farklı metilasyon profillerinin varlığı gösterilmiştir (Yu ve ark., 2015). DNA metilasyonu çalışmaları, PKOS'tan etkilenen farklı dokular ve hücrelerde farklı şekilde metile edilmiş genlerin glukoz, lipid metabolizması ve hormon sentezi gibi ilgili yollarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Y. N. Liu ve ark., 2022). Shen ark. (2013), insülin direnci olan ve olmayan PKOS'u olan kadınlarda DNA

metilasyonundaki değişikliklerle ilişkili olarak inflamasyon ve metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan genlerin bozulmuş ekspresyonuyla açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. PKOS'lu kadınlar ile PKOS olmayan kadınlar arasında farklı CpG metilasyon bölgesi tespit edilmiştir Y. D. Liu ark. (2017), spesifik CpG bölgelerindeki metilasyon düzeyleri ile PKOS'lu kadınlardaki E2 ve prolaktin serum konsantrasyonları arasında bir ilişki olduğunu ve bunun HPO aksındaki bozulmalarla ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Sıçanlarda PKOS benzeri bir fenotip, over dokusundaki DNA metilasyon düzeylerinde, üreme organlarının gelişimi ve hormonla ilişkili süreçlerde görev alan genlerin promotör bölgelerinde görülen değişikliklerle ilişkilendirilmektedir (D. Zhang ve ark., 2014).

PKOS'un patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, ortaya çıkan kanıtlar genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşime işaret etmektedir (Bruni ve ark., 2021). Ovaryan korteksteki oositler ile somatik hücreler arasındaki iletişimin bozulması foliküler arrestle sonuçlanır ve oositlerin gelişimsel yetkinliğini azaltarak infertiliteyi daha da ağırlaştırır (Chen ve ark., 2024; Lohrasbi ve ark., 2022). Son çalışmalar, özellikle DNA metilasyonu başta olmak üzere epigenetik modifikasyonların oosit maturasyonu ve folikülogenez sırasındaki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Seem ve ark., 2024; Vanselow ve ark., 2018).

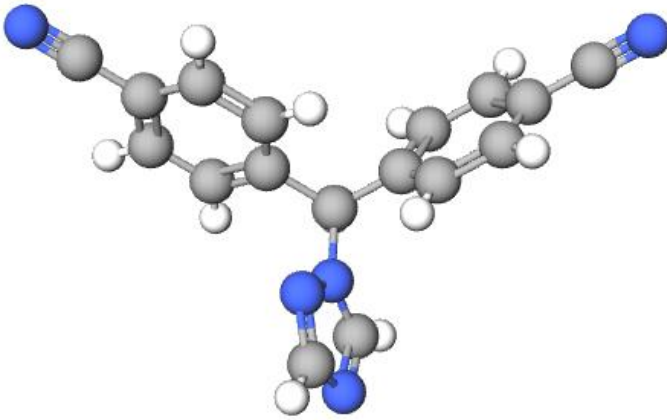
DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen ve genomik stabilitenin korunması ile transpozon elementlerinin susturulması için kritik olan bir süreçtir; bu sayede oositler genom içi strese korunur (Gu ve ark., 2010; Vanselow ve ark., 2018). Bununla birlikte, PKOS'un belirgin bir özelliği olan oksidatif stres, kromatin yapısını ve DNA metilasyon paternlerini değiştirerek bu epigenetik süreçleri bozabilir (García-Giménez ve ark., 2021). ROS, yalnızca DNA hipermetilasyonunu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda histon modifikasyonlarını da etkileyerek oosit maturasyonunun bozulmasına ve endometrial disfonksiyona yol açar (Aranda ve Pascual, 2001; Dutta ve ark., 2024).

2.6. Polikistik Over Sendrom Modelleri

PKOS hayvan modelleri, literatürde farklı yöntemler kullanılarak indüklenmiştir. Örneğin, Kamada ark. (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, PKOS hayvan modelinin oluşturulmasında dihidrotestosteron ile birlikte yüksek yağlı diyetin uygulandığı rapor edilmiştir. Farklı bir çalışmada ise PKOS hayvan modelinin yalnızca dihidrotestosteron uygulaması ile indüklendiği bildirilmiştir (Mahmoud ve ark., 2022). Başka bir çalışmada, PKOS hayvan modelinin letrozol ve yüksek yağlı diyet kombinasyonu ile oluşturulduğu rapor

edilmiştir (Mirseyyed ve ark., 2023). Yapılan farklı bir çalışmada, PKOS hayvan modelinin dehidroepiandrosteronun subkutan enjeksiyonu ile indüklendiği bildirilmiştir (W. Zhang ve ark., 2024). Diğer bir çalışmada ise, PKOS hayvan modelinin E2 valerat enjeksiyonu ile oluşturulduğu rapor edilmiştir (Raoofi ve ark., 2022). Mevcut çalışmamızda, literatür doğrultusunda 21 gün süreyle PKOS hayvan modeli oluşturulmuştur (Ataabadi ve ark., 2023; Mvondo ve ark., 2020).

Letrozol, PKOS benzeri semptomları indükleyen bir sitokrom P450 aromataz inhibitörüdür (Şekil 2.7). Aromataz, testosteronu (T) E2'e ve androstenedionu östrona dönüştüren bir enzimdir. Letrozol, nonsteroidal bir aromataz inhibitörü olarak androjenlerin östrojene dönüşümünü engeller ve böylece androjen seviyesini artırır. Letrozol ayrıca, PKOS'lu kadınlarda görülen kilo artışı, over boyutlarında büyüme, teka iç tabakasında kalınlaşma ve anovulasyon gibi benzer değişikliklere neden olur (Osuka ve ark., 2019; Ryu ve ark., 2019). Bu nedenle letrozol, PKOS hayvan modellerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır ve çoğunlukla postnatal dönemde uygulanmıştır.



Şekil 2.7. Letrozol kimyasal yapısı (<https://molview.org/>).

Letrozol ile tedavi edilen sıçan ve fareler tamamen asiklik hale gelmiştir. Bu sıçan modelinden alınan vajinal yaymalarda, diöstrus fazının baskın hücre tipi olan bol miktarda lökosit gözlemlenmiştir (Mannerås ve ark., 2007).

Letrozol ile tedavi edilen sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla over ağırlığı, en büyük folikül alanı ve kistik folikül sayısında artış gözlenmiş; ayrıca overlerinde atreziye uğramış antral foliküller ve foliküler kistler bulunmuştur. Letrozol ile tedavi edilen farelerin overlerinde ise kontrol grubuna göre sağlıklı büyük antral foliküller ve hemorajik kistlerin sayısında artış tespit edilmiştir (Mirseyyed ve ark., 2023).

Letrozol ile tedavi edilen sıçanlarda serum LH, FSH ve testosteron düzeyleri, östrus ve diöstrus dönemlerinde kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Ayrıca bu sıçanlarda serum E2 ve progesteron düzeyleri, sırasıyla proöstrus ve diöstrus kontrollerine göre daha düşük bulunmuştur (Osuka ve ark., 2019). Letrozol ile tedavi edilen farelerde ise serum testosteron düzeyleri yüksek, buna karşın LH ve FSH, E2 düzeyleri kontrol grubuyla benzer bulunmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Etik Kurul Onayı

Çalışmamızın Etik Kurul İzni, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 22.06.2023 tarih ve 2023/ 46 nolu kararı ile alınmıştır.

3.2. Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmamız için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM) deney hayvanları laboratuvarından toplamda 30 adet ve ağırlıkları 250 - 300 gram arasında değişen *Sprague Dawley* dişi sıçanlar temin edildi. Deney bitimine kadar hayvanlara *ad libitum* içme suyu ve standart sıçan yemi verildi ve standart sıcaklık ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nem (%5-10) koşullarında, 12:12 saat ışık-karanlık döngüsü altında günlük bakımları yapıldı.

3.3. Deney Grupları

Toplam 30 adet sıçan, her grupta 6 hayvan olacak şekilde random olarak 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki 4 gruba 1 mg/kg/gün Letrozol 21 gün boyunca 1 mL oral gavage ile uygulandı. Kontrol grubuna aynı sürede 1 mL serum fizyolojik oral gavage ile verildi. 21 gün sonunda PKOS oluşturulan gruplarda ilaç uygulamasına geçildi. 20 gün sonunda deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

Grup 1: Kontrol grubu (SF)

Grup 2: PKOS grubu (1 mg/kg Letrozol)

Grup 3: PKOS + Metformin grubu (300 mg/kg metformin)

Grup 4: PKOS + Ethinylestradiol (0.5 mg/kg) /Drospirenone (2.5 mg/ kg)

Grup 5: PKOS + Metformin (300 mg/kg) + Ethinylestradiol (0.5 mg/ kg) /Drospirenone (2.5 mg/ kg)



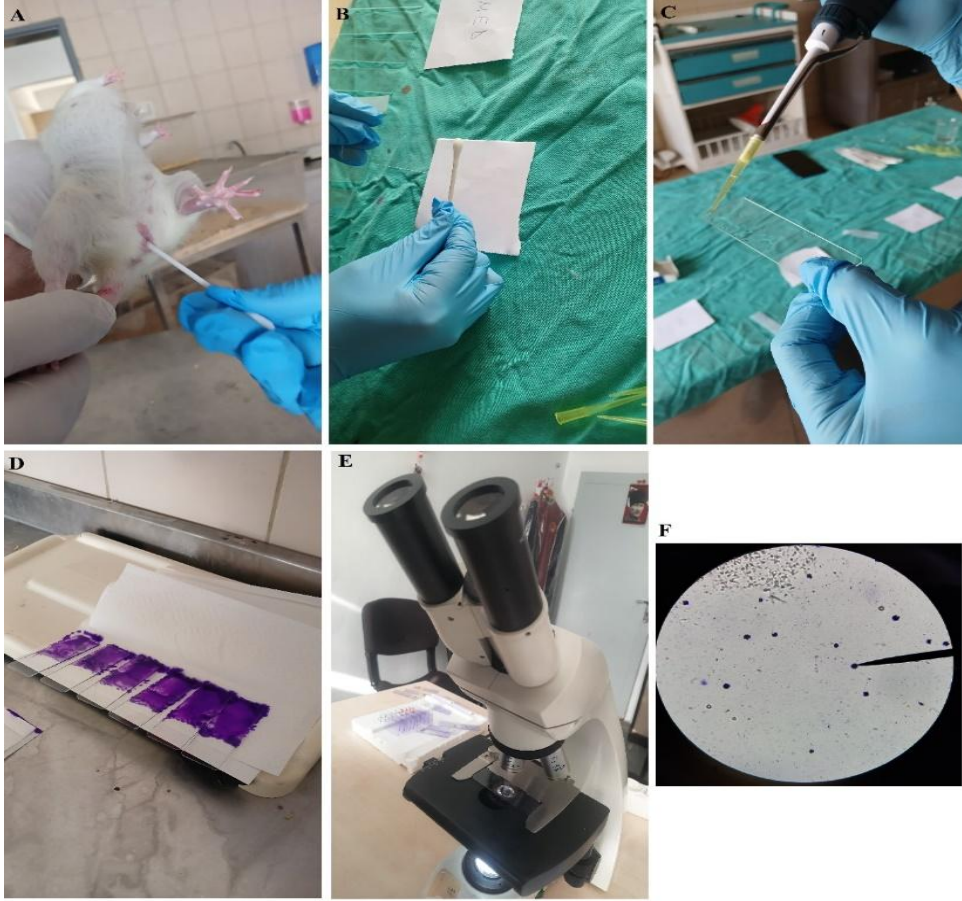
Şekil 3.1. Kontrol, PKOS, MET, EE/DRSP ve MET + EE/DRSP deney grupları.

3.4. Polikistik Over Sendrom Modeli

PKOS modeli oluşturulmadan önce sıçanların ağırlıkları tartıldı. 21 gün boyunca 1mg/kg Letrozol (Katolog numarası; PHR1540 Sigma Aldrich), %0,5 karboksimetil selüloz (CMC, Katolog numarası; 9004-32-4 Sigma Aldrich) içinde çözülerek oral gavage ile verildi ve süre sonunda sıçanların tartımları tekrar yapıldı. Deney süresince günlük olarak her bir sıçanın vajinal sürüntü örneğinden yayma yapılarak östrus döngüsü takibi yapıldı.

3.5. Vajinal Yayma

Deney modelinin oluşup oluşmadığını doğrulamak amacıyla sıçanların östrus döngüsünün belirlenmesi için her gün aynı saatte vajinal smear örnekleri incelendi. Sıçanların vulva bölgesi %70'lik etil alkol ile silindikten sonra, mikropipetin içine 0,5 mL serum fizyolojik çekilerek birkaç defa vajina içerisine verilip geri çekildi. Steril pamuklu çubuklar kullanılarak, hayvanın vajinal bölgesinden hücre örnekleri alındı ve lam üzerine yayılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra lam üzerine %70 metanol fiksasyon için uygulanarak tekrar kurumaya bırakıldı. Sonra %1'lik Toluidin mavisi ile preparatlar 5 dk boyandı. Ardından ışık mikroskobu ile incelenerek östrus evreleri tespit edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Vajinal yayma: Sıçanların östrus döngüsünün belirlenmesi.

3.6. İlaç Uygulama Prosedürü

Metformin (Cat No.1115-70-4, Cayman) distile suda çözülerek günlük hazırlanan stok çözeltisinden 300 mg/kg olacak şekilde günde 1 kez 1 mL oral olarak gavajla verildi. Ethinylestradiol (Cat No.57-63-6, Cayman) /drospirenone (Cat No.67392-87-4, Sigma Aldrich) ve 0,5 mg/ kg Ethinylestradiol / 2,5 mg/ kg Drospirenone olacak şekilde günlük hazırlanan stok çözeltisinden günde 1 mL hacminde 1 kez oral gavajla verildi. Deney protokolü 20 gün boyunca oral olarak uygulandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sıçanlara oral gavaj ile ilaçların verilmesi.

3.7. Deneyin Sonlandırılması

Her gruptaki sıçanlar Ketazol (40 mg/kg i.m.) ve Xylazine (7 mg/kg i.p.) ile anestezi altına alındı. Sıçanların ayağı penset ile sıkıştırılarak tepkime verip vermemeleri kontrol edildikten sonra batınları açıldı. Biyokimyasal analizler için, kardiyak ponksiyon ile 3 mL kan sarı kapaklı jelli tüp içerisine ve epigenetik çalışmalar için de 2 mL tam kan EDTA'lı tüplere alındı. Daha sonra sıçanlar %4'lük paraformaldehit ve %4'lük gluteraldehit solüsyonları ile kardiyak perfüzyon gerçekleştirildi. Daha sonra her bir sıçanın sağ ve sol ovaryumları alınarak sıvı azot ile muamele edildi (Şekil 3. 4). Kan örnekleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında 10 dakika boyunca 3500 xg' de santrifüj edildi ve serum örneklerinde FSH, LH, E2 ve Testosteron konsantrasyonları ELISA yöntemi ile belirlendi.



Şekil 3.4. Sıçanları anestezi altına alınması, kalpten alınması ve over dokularının çıkarılması.

3.8. Rat Luteinizan Hormon (LH) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Serum Rat Luteinizan Hormon (LH) konsantrasyonları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında ticari olarak piyasada bulunan Rat LH ELISA kit (Reed Biotech Ltd.Şti., Cat No. RE2741R, Wuhan, Çin) ile sandwich metod enzim linked immunosorbent assay yöntemi ile çalışıldı. Tüm çalışma çözeltileri taze olarak hazırlandı ve kullanmadan önce oda ısısında (25 °C) bekletildi.

Rat LH standartı kullanılarak seri dilüsyon yöntemiyle, 8 adet standart (S1-0 mIU/mL, S2-1,57 mIU/mL, S3-3,13 mIU/mL, S4-6,25 mIU/mL, S5-12,5 mIU/mL, S6-25 mIU/mL, S7-50 mIU/mL ve S8-100 mIU/mL) hazırlandı. ELISA plate üzerinde kör, standartlar ve örnekler için kuyucuklar belirlendi. Standartlara örnekler ile aynı prosedür uygulandı. Belirlenmiş kuyucuklara 100 µL standart (S1-S8) eklendi ve örnekler pipetlendi, 37°C' de 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Daha sonra standart ve numune kuyucuklarına 100 µL

biotinylated detecting antibody solution pipetlendikten sonra 37°C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP conjugate solution ilave edilerek 37°C' de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Sonrasında 100 µL substrate reagent solution pipetlenerek 37°C' de 15 dk. karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 50 µL stop solution pipetlenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda BioTek Synergy-4 (Seri no.233513, USA) marka Microplate reader kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

LH konsantrasyonları, standart değerleri kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre hesaplandı ve elde edilen konsantrasyonlar mIU/mL olarak ifade edildi. Kit sensitivity 0,94 mIU/mL ve CV <%5, ölçüm aralığı ise 1,57 mIU/mL - 100 mIU/mL arasında verilmişti. Yüksek konsantrasyonlu örnekler dilüe edilerek iki kez çalışılarak doğrulandı.

3.9. Rat Follikül Stimulan Hormon (FSH) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Serum Rat Follikül Stimulan Hormon (FSH) konsantrasyonları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında ticari olarak piyasada bulunan Rat FSH ELISA kit (Reed Biotech Ltd.Şti., Cat No. RE3021R, Wuhan, Çin) ile sandwich metod enzim linked immunosorbent assay yöntemi ile çalışıldı. Tüm çalışma çözeltileri taze olarak hazırlandı ve kullanmadan önce oda ısısında (25 °C) bekletildi.

Rat FSH standartı kullanılarak seri dilüsyon yöntemiyle, 8 adet standart (S1-0 ng/mL, S2-3,13 ng/mL, S3-6,25 ng/mL, S4-12,5 ng/mL, S5-25 ng/mL, S6-50 ng/mL, S7-50 ng/mL ve S8-100 ng/mL) hazırlandı. ELISA plate üzerinde kör, standartlar ve örnekler için kuyucuklar belirlendi. Standartlara örnekler ile aynı prosedür uygulandı. Belirlenmiş kuyucuklara 100 µL standart (S1-S8) ve örnekler pipetlendi, 37°C' de 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Daha sonra standart ve numune kuyucuklarına 100 µL biotinylated detecting antibody solution pipetlendikten sonra 37°C'de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP conjugate solution ilave edilerek 37°C' de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Sonrasında 100 µL substrate reagent solution pipetlenerek 37°C' de 15 dk. karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 50 µL stop solution pipetlenerek reaksiyon

durduruldu. Çalışma sonunda BioTek Synergy-4 (Seri no.233513, USA) marka Microplate reader kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

FSH konsantrasyonları standart değerleri kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre hesaplandı ve elde edilen konsantrasyonlar ng/mL olarak ifade edildi. Kit sensitivity 1,88 ng/mL ve CV < %5, ölçüm aralığı ise 3,13 ng/mL- 200 ng/mL arasında verilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu örnekler dilüe edilerek iki kez çalışılarak doğrulandı.

3.10. Rat Östradiol (E2) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Serum rat östradiol (E2) konsantrasyonları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında ticari olarak piyasada bulunan Rat E2 ELISA kit (Reed Biotech Ltd.Şti., Cat No. RE10177, Wuhan, Çin) ile sandwich metod enzim linked immunosorbent assay yöntemi ile çalışıldı Tüm çalışma çözeltileri taze olarak hazırlandı ve kullanmadan önce oda ısısında (25 °C) bekletildi.

Rat E2 standartı kullanılarak seri dilüsyon yöntemiyle, 8 adet standart (S1-0 pg/mL, S2-S2-12,5 pg/mL, S5-25 pg/mL, S6-50 pg/mL, S7-100 pg/mL, S8-200 pg/mL, S8-400 pg/mL ve S8-800 pg/mL) hazırlandı. ELISA plate üzerinde kör, standartlar ve örnekler için kuyucuklar belirlendi. Standartlara örnekler ile aynı prosedür uygulandı. Belirlenmiş kuyucuklara 100 µL standart (S1-S8) ve örnekler pipetlendi, 37°C' de 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Daha sonra standart ve numune kuyucuklarına 100 µL biotinylated detecting antibody solution pipetlendikten sonra 37°C'de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP conjugate solution ilave edilerek 37°C' de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Sonrasında 100 µL substrate reagent solution pipetlenerek 37°C' de 15 dk. karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 50 µL stop solution pipetlenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda BioTek Synergy-4 (Seri no.233513, USA) marka Microplate reader kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

Rat E2 konsantrasyonları standart değerleri kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre hesaplandı ve elde edilen konsantrasyonlar pg/mL olarak ifade edildi. Kit sensitivity 7,5 pg/mL ve CV < % 5, ölçüm aralığı ise 12,5 pg/mL - 800 pg/mL arasında verilmişti. Yüksek konsantrasyonlu örnekler dilüe edilerek iki kez çalışılarak doğrulandı.

3.11. Rat Testosteron Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Serum Rat Testosteron konsantrasyonları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında ticari olarak piyasada bulunan Rat Testosteron ELISA kit (Reed Biotech Ltd.Şti., Cat No. RE10175, Wuhan, Çin) ile sandwich metod enzim linked immunosorbent assay yöntemi ile çalışıldı Tüm çalışma çözeltileri taze olarak hazırlandı ve kullanmadan önce oda ısısında (25 °C) bekletildi.

Rat Testosteron standartı kullanılarak seri dilüsyon yöntemiyle, 8 adet standart (S1-0 ng/mL, S2-0,16 ng/mL, S3-0,31 ng/mL, S4-0,63 ng/mL, S5-1,25 ng/mL, S6-2,5 ng/mL, S7-5 ng/mL ve S8-10 ng/mL) hazırlandı. ELISA plate üzerinde kör, standartlar ve örnekler için kuyucuklar belirlendi. Standartlara örnekler ile aynı prosedür uygulandı. Belirlenmiş kuyucuklara 100 µL standart (S1-S8) ve örnekler pipetlendi, 37°C' de 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Daha sonra standart ve numune kuyucuklarına 100 µL biotinylated detecting antibody solution pipetlendikten sonra 37°C' de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP conjugate solution ilave edilerek 37°C' de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plate otomatik yıkayıcı yardımıyla 3 kez 350 µL yıkama solusyonu ile yıkandı. Sonrasında 100 µL substrate reagent solution pipetlenerek 37°C' de 15 dk. karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 50 µL stop solution pipetlenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda BioTek Synergy-4 (Seri no.233513, USA) marka Microplate reader kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

Testosteron konsantrasyonları standart değerleri kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre hesaplandı ve elde edilen konsantrasyonlar ng/mL olarak ifade edildi. Kit sensitivity 0,09 ng/mL ve CV<5%, ölçüm aralığı ise 0,16 ng/mL - 10 ng/mL arasında verilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu örnekler dilüe edilerek iki kez çalışılarak doğrulandı.

3.12. Kan ve Dokuda RNA İzolasyonu

Tüm deney gruplarına ait kan ve over doku örneklerinden total RNA izalasyonu için; EDTA'lı kan örneğinden 200µl alındı ve dokular için 10 mg örnek alınarak 1,5 mL 'lik steril ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra, üzerine 1 mL Trizol (bir guanidinium thiocyanate solüsyonu) ilave edilerek vortekslenip oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Sonra, karışıma 200 µl kloroform ilave edilerek 30 saniye vortekslendi ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.

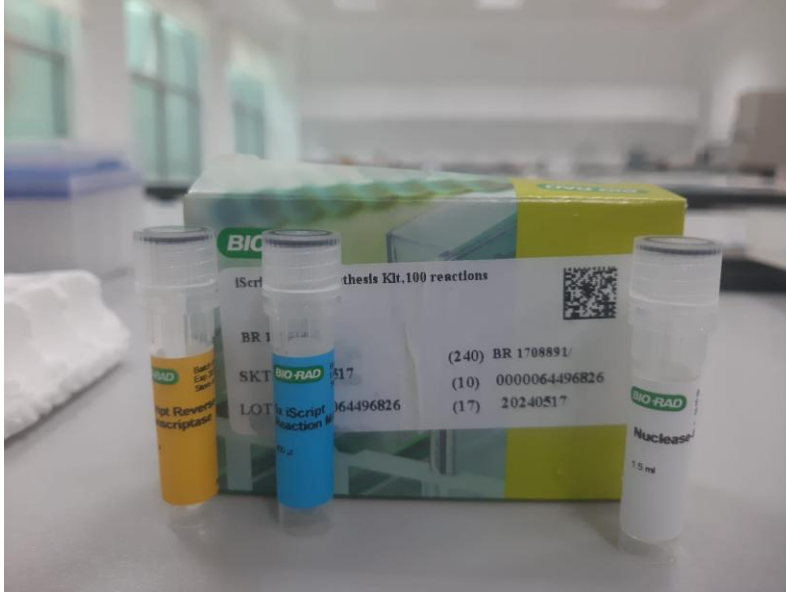
Daha sonra tüm bu lizis karışımı 4 °C’de 14000xg’ de 10 dk santrifüj edildi ve sonra en üstteki berrak faz yeni ependorf tüplere aktarıldı. Üstteki fazdan alınan kısma izopropanol eklenerek vorteks yapıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra RNA presipitasyonu için 4 °C’de 10000xg de 20 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra RNA pelletine 1 mL %75’lik etanol ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. 4 °C de 14000xg de 5 dk santrifüj işleminin ardından bu yıkama işlemi tekrarlandı ve etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 50 µl nükleaz içermeyen steril su eklenerek RNA örneği sulandırıldı. Sonrasında her bir RNA örneğinin miktarı ve saflığı 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanlarının spektrofotometrik olarak bir nanodrop ile ölçülmesiyle belirlendi. İdeal saflıktaki RNA’nın A260/ A280 absorban oranının 1.8-2.0 olması beklenmektedir. Elde edilen RNA örnekleri PCR çalışmalarında kullanılabilecek kadar -80°C’ de muhafaza edildi (Şekil 3. 5).



Şekil 3.5. Kan ve over dokusundan RNA izolasyonunun aşamaları.

3.13. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

RT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere, izole edilen RNA örneklerinden komplementer cDNA sentezi için Bio-Rad firmasına ait iScript™ cDNA Sentez Kiti kullanıldı (Şekil 3. 6). Tablo 3.1. de belirtilen miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlandı ve tablo 3.2. de ki ısı ve döngülere göre cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.6. RNA örneklerinden komplementer DNA sentezi için cDNA reverse transkript kit.

Tablo 3.1 20 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Hacim
5x iScript Mix	4 µL
Ters transkripsiyon (RT)	1 µL
RNA örneği + RNaz içermeyen su	15 µL
Total hacim	20 µL

Hazırlanan karışım termal döngü cihazına (BIO-RAD/T100) yerleştirildi.

Tablo 3.2. Revers transkriptaz termal döngü protokolü.

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Başlatma	25	5
Ters transkripsiyon (RT)	46	20
RT inaktivasyonu	95	1
Optimum aşama	4	-

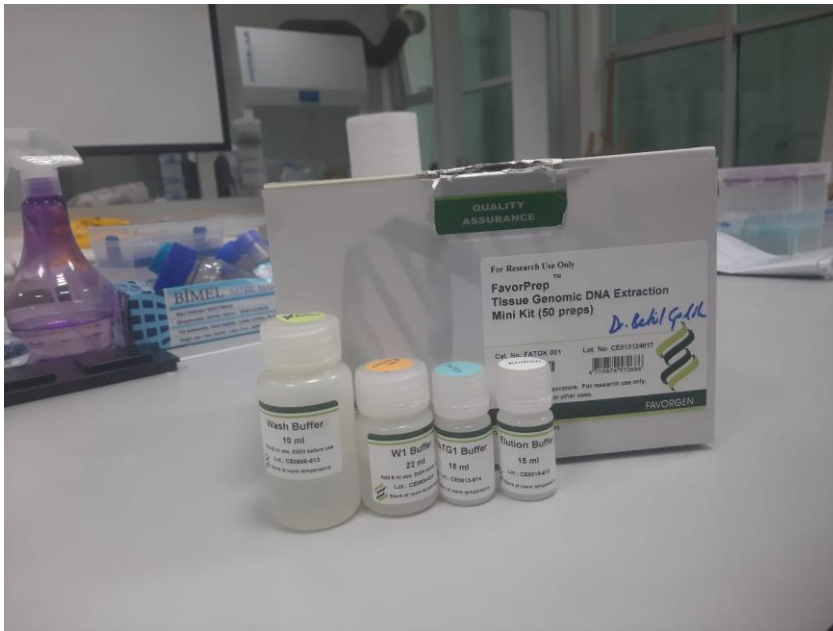
3.13.1. RT-PCR analizi

Real-Time PCR analizi için “SsoAdvanced Universal 2X SYBR Green Super Mix (with ROX) (Bio-Rad)” kiti kullanıldı. Kitin protokolüne göre, toplam 10 µl reaksiyon hacmi için; 5 µl 2X SYBR Green Super Mix, sentezlenen cDNA örneklerinden 100ng/ 2 µl, 20 pmol/0,3 µl forward ve revers primerlerin her birinden ve 2,4 µl nükleaz içermeyen su ile karışım hazırlandı. 96-kuyucuklu plate’de, her bir örnek için en az üç tekrarlı olarak ve referans gen olarak GAPDH kullanılarak Real-Time PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. PCR reaksiyon koşulları için kullanılacak program kitin protokolüne göre; başlangıç denatürasyonu için 98 °C’de 3dk, ardından 40 döngü olacak şekilde denatürasyon için 98°C’de 15sn ve bağlanma/uzama için 60°C’de 1dk olarak uygulandı. Reaksiyon sonucunda

gen ekspresyon düzeyleri, elde edilen Ct değerleri kullanılarak, hedef RNA'ların Ct değerlerinin endojen kontrolün Ct değerine normalize edildiği $\Delta\Delta Ct$ metodu ile belirlendi. Gen ekspresyonundaki rölatif değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre hesaplandı.

3.14. Kan ve Over Dokularından DNA İzolasyonu

Dişi Sprague-Dawley sıçanları deney prosedürleri tamamlandıktan daha sonra kan ve over dokularından genomik DNA'nın izolasyonu için, ticari bir genomik DNA izolasyon kiti kullanıldı ve kitin protokolü uygulandı (Şekil 3. 7). Elde edilen DNA numunelerinin konsantrasyonları ve saflıkları bir nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Sonrasında, metilasyon analizi için bu DNA örneklerine bisüfit modifikasyonu işlemi uygulandı.



Şekil 3.7. Kan ve over dokusundan DNA izolasyon kit.

200 μ l örnek (EDTA'lı tam kan) veya 25 mg over doku numunesi mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Örneğe 20 μ l Proteinaz K eklendi ve ardından 200 μ l FATG2 Buffer (Lizis Tamponu 2) ilave edildi. Karışım pulse-vortex (kısa ve ardışık çalkalama) ile tamamen homojenleştirildi. Numune 60°C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında ara ara vortex yapıldı. Numune 70°C sıcaklıkta 10 dakika daha inkübe edildi. Karışıma 200 μ l etanol (%96–100) eklendi ve tekrar pulse-vortex ile iyice karıştırıldı. Tüp, kapağın iç yüzeyindeki damlaların uzaklaştırılması amacıyla kısa süreli santrifüj edildi. Bir FATG Mini Kolon (Silika bazlı dna bağlayıcı kolon), bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Hazırlanan karışım dikkatlice kolona aktarıldı. Numune tam hızda (~18.000 x g) 1 dakika santrifüj edildi ve FATG Mini kolon yeni bir toplama Tüpü içerisine aktarıldı. Kolona 400 μ l W1 Buffer (Yıkama Tamponu 1) eklenir. Tam hızda 1 dakika santrifüj edildi ve akışkan atıldı. Kolona

750 µl Wash Buffer (Yıkama Tamponu 2) eklendi. Tam hızda 1 dakika santrifüj edildi ve akışkan atıldı. Kolon, kalıntı sıvıların tamamen uzaklaştırılması amacıyla tam hızda 3 dakika daha santrifüj edildi. 100 µl kadar önceden 70°C'ye sıcaklığa ısıtılmış Elution Buffer'ı (Elüsyon tamponu) veya ddH₂O (pH 7.5–9.0)'yu FATG Mini kolonunun membran merkezine dikkatlice uygulanır. FATG Mini kolonu 3 dakika kadar bekletildi. DNA'yı elüe etmek için kolon tam hızda 2 dakika santrifüj edildi.

3.15. DNA'nın Bisülfıt Modifikasyonu

Steril bir PZR tüpüne 500ng genomik DNA içeren 20µl DNA örneği konuldu. 20µl'den az olan DNA örneklerinin hacmi ise, steril bidistile su ilave edilerek son hacmi 20µl'ye tamamlandı. 500ng/20µl DNA içeren PZR tüpüne, önceden hazırlanmış olan 120µl 'Modification Reagent' solüsyonu eklendi, pipetaj yapılarak karıştırıldı. PZR tüpü kuru ısı bloğunda 98°C'de 10 dakika ve hemen ardından 60°C'de 150 dakika bekletildi. Bir toplama tüpü içerisindeki 'DNA Purification Micro Column' mini kolonuna 400µl 'Binding Buffer' eklendi. Sonra içerisine, 3. Aşamadaki bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örneği 'Binding Buffer' içerisine ilave edildi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı. Toplama tüpü içindeki mini kolon, oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Mini kolona 200µl 'Wash Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Mini kolona 200µl 'Desulfonation Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Toplama tüpü içindeki mini kolon, oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Mini kolona 200µl 'Wash Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve mini kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Mini kolona tekrar 200µl 'Wash Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı. Mini kolon, steril 1.5ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi. Mini kolona 10µl 'Elution Buffer' eklendi ve oda sıcaklığında 12,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Mini kolon atıldı. Elde edilen bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örneği, Metilasyon Spesifik PZR (MSP)'da kullanıldı. Hemen kullanılmayan örnekler -20°C'de muhafaza edildi.

3.16. Metilasyon Spesifik PCR (MSP)

Metilasyon Spesifik PCR yöntemi, bisülfıt dönüşümü yapılmış DNA örneklerinde, CpG adacıklarındaki metilasyon durumunun belirlenmesinde kullanıldı. DNA'nın bisülfıt ile

muamelesi, kimyasal olarak metile olmayan sitozinleri urasile dönüştürürken, metile olan sitozinler değişmeden kalırlar. Bunun sonucunda, bisülfite muamelesi yapılmış DNA’da artık orijinal baz eşleşmesi ortadan kalkar. Bu nedenle MSP yönteminde *Trpv1* ve *Trpm2* genlerinin promotör bölgelerini çoğaltmak için, metilasyona özgül olan primerler (MSP) ve metilasyona özgül olmayan primerler (USP) tasarlandı. Metilasyona özgül PCR primerlerini tasarlamak için, ‘www.ensembl.org’ sitesinden elde edilen gen promotör dizileri ‘http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi’ adresindeki veri tabanına girilerek MSP ve USP primerler tasarlandı. MSP yönteminde kullanılan primer dizileri Tablo 3.3. de verilmiştir.

Tablo 3.3. Metilasyon spesifik PCR primer dizileri.

Gen	Primer Dizisi
<i>Trpv1</i> MSP-F	5'-GGAATTTTACGTTAGAGGC-3'
<i>Trpv1</i> MSP-R	5'-CGACCTACCAAATTAATAACGTA-3'
<i>Trpv1</i> USP-F	5'-GGAATTTTACGTGTTAGAGGTG-3'
<i>Trpv1</i> USP-R	5'-AACCTACCAAATTAATAACATAA-3'
<i>Trpm2</i> MSP-F	5'-GTAGTTTGGGGTTAAAGGCG-3'
<i>Trpm2</i> MSP-R	5'-GACGTTCTTCCAAACTCGAA-3'
<i>Trpm2</i> USP-F	5'-GGGTAGTTTGGGGTTAAAGGT-3'
<i>Trpm2</i> USP-R	5'-GGGTAGTTTGGGGTTAAAGGT-3'

MSP yönteminde, Taq DNA polimeraz enzim kiti (Thermo Fisher, Litvanya) ve metilasyona özgül oligonükleotit primerler kullanıldı. MSP reaksiyon karışımı için; toplam 25µl’lik reaksiyon hacmi için, 2.5 µl PCR tamponu, 0.2 µl/200 µM dNTP mix, 20pmol/µl forward primer, 20pmol/µl revers primer, 150ng/3µl bisülfite modifiye DNA örneği, 1.25U Taq DNA polimeraz enzimi ve steril su kullanıldı.

Metilasyon spesifik PCR protokolü için: Başlangıç denatürasyonu için 95°C’de 3dk, sonrasında 40 döngü şeklinde 95°C’de 40sn denatürasyon, 57°C’de primer bağlanması ve 72°C’de 70sn uzama yapıldı. Sonrasında 72°C’de 7dk son uzama yapılarak reaksiyon sonlandırıldı.

MSP sonrasında PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi ve metile-spesifik primerle amplifiye olan örnekler ile unmetile-spesifik primerle amplifiye olan örneklerin bant yoğunlukları ImageJ programında analiz edilerek metilasyon durumları değerlendirildi.

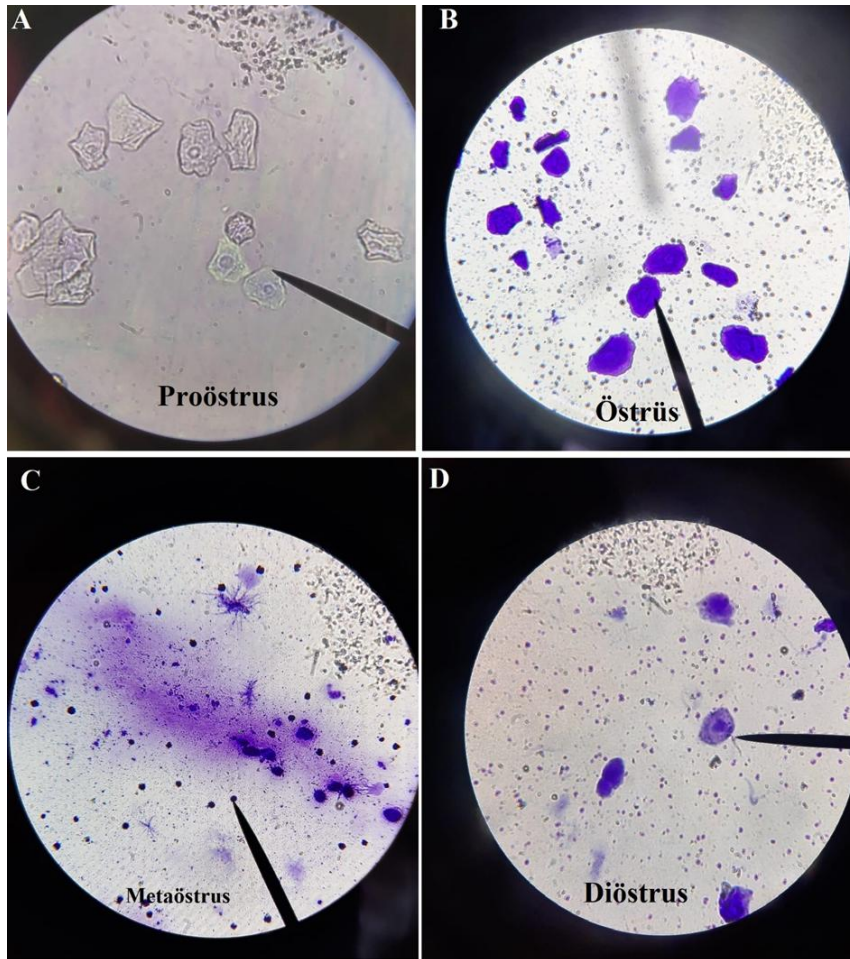
3.17. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada hormon düzeyleri, gen ekspresyonu, DNA metilasyonu ve deney süresince izlenen ağırlık değişimleri IBM SPSS Statistics 21.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlere başlamadan önce tüm değişkenler için dağılım özellikleri incelenmiş; Shapiro–Wilk testi sonuçlarına göre verilerin normal dağılım gösterdiği, Levene testi bulgularına göre varyansların homojen olduğu saptanmıştır. Bu nedenle parametrik istatistiksel yöntemlerin uygulanması mümkün olmuş ve tüm analizlerde bu yaklaşım izlenmiştir. Gruplar arasındaki ve gruplar içerisindeki farklılıkları değerlendirmek amacıyla ağırlık değişimleri, hormon konsantrasyonları, gen ekspresyon düzeyleri ve metilasyon oranları için tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) yürütülmüş; anlamlı modellerde grup farklılıklarının yönünü belirlemek üzere Tukey HSD veya Duncan çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır. Gen ekspresyonu ve metilasyon düzeylerinde hem grup hem doku etkilerini ve bu iki faktörün etkileşimi arasındaki doğrusal ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirilmiş; korelasyon katsayıları (r), kovaryans değerleri ve anlamlılık düzeyleri raporlanmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiş, tablo olarak gösterimlerde ortalama \pm standart hata değerleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. PKOS Modeli

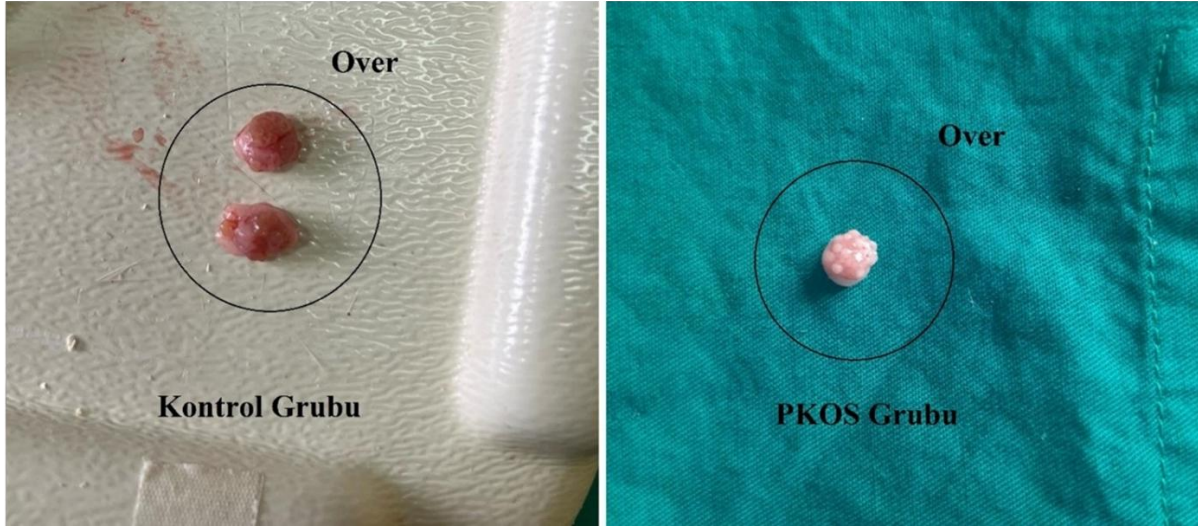
Östrüs siklusunun evreleri vaginal smear örneklerinde görülen üç tip hücrenin oranına göre karakterize edilmektedir. Bu hücre tipleri epitel hücreler, kornifiye hücreler ve lökositlerdir. Proöstrus evresinde çok sayıda çekirdekli epitelyum hücreleri ve bunun yanında nötrofiller, lökositler ve çekirdeksiz hücreler görülür. Östrus evresinde sadece çekirdeksiz üst üste gelmiş yassı hücreler görülür. Metaöstrus evresinde üç hücre tipi de görülür fakat yoğun olarak çekirdeksiz hücreler ve nötrofil lökositler görülür. Diöstrus evresinde ise nötrofil lökositler yoğun bir şekilde görülürken az sayıda da çekirdekli hücreler görülür (Şekil 4.1).



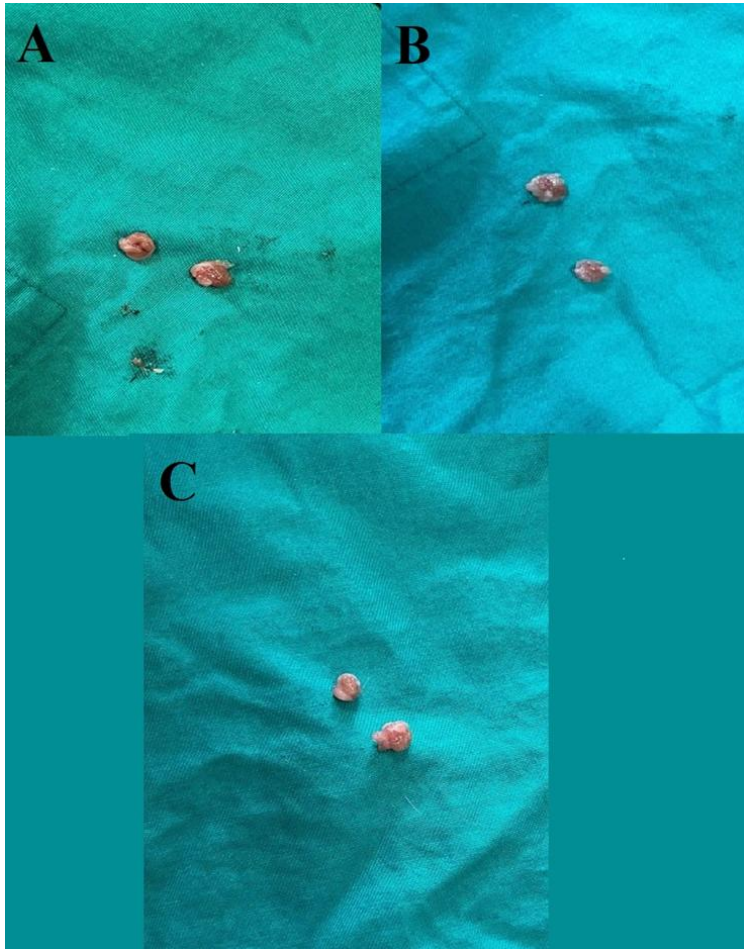
Şekil 4.1. PKOS rat modelinde östrüs siklusunun vajinal smear görüntüleri A) proöstrus, B) östrus, C) metaöstrus ve D) diöstrus evreleri.

Gruplarda PKOS modelinin oluştuğunu tespit etmek için 21 gün boyunca östrüs döngüsü takip edildi. Sıçanlardan alınan vajinal smear örneklerinin sonuçlarına göre PKOS'un oluşturulduğu doğrulandı (Şekil 4.2). Kontrol grubuna ait sıçanlar düzenli östrüs

siklusu gösterirken, diğ er gruplara ait sıç anlar dü zensiz, uzamış östrus siklusu göstermiştir (Ş ekil 4.3).



Ş ekil 4.2. A) Over dokusu kontrol grubu sağlıklı overler; B) Over dokusu PKOS grubunda oluş an polikistik g r n m.



Ş ekil 4.3. Metformin grubu (A), EE/ DRSP grubu (B) ve Metformin + EE/DRSP grubuna (C) ait makroskobik over g r n mleri.

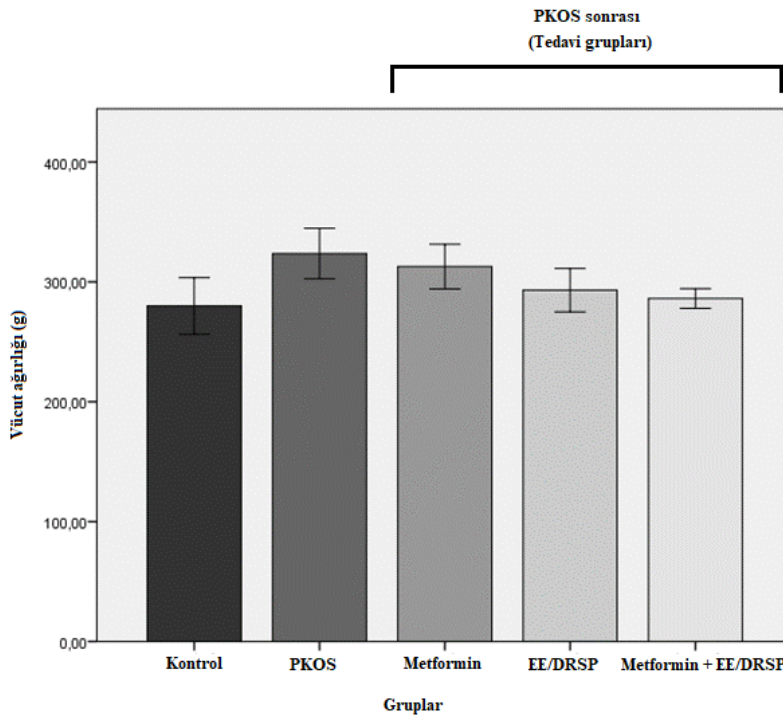
4.2. Canlı Ağırlık Bulguları

Gruplar arasında kontrol grubuna ait sıçanların canlı ağırlığının en düşük olduğu belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla PKOS grubu canlı ağırlıklarında anlamlı bir artış gösteriyordu ($p < 0.05$). Metformin grubu, EE/DRSP grubu, Metformin + EE/DRSP grupları ile kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunurken ($p < 0.05$); Metformin grubu ve EE/DRSP grubu ile PKOS grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Metformin ve EE/DRSP grupları arasında da anlamlı fark olmadığı ve bu değerlerin birbirine benzer olduğu ve PKOS grubu ile de benzer olduğu tespit edildi ($p > 0.05$). Metformin + EE/DRSP kombine uygulanan tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farkın bulunduğu ($p < 0.05$) ve bu düşüş sonucu PKOS grubu ile arasında anlamlı farklılığın kalmadığı tespit edildi ($p > 0.05$). Tüm gruplara ait canlı ağırlık ölçümlerinin istatistiksel analizi Tablo 4.1 ve Şekil 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Grupların sıçan canlı ağırlıkları (ortalama \pm standart sapma).

Gruplar	Ortalama \pm SS
Kontrol grubu	274,3 ^c \pm 27.76
PKOS Grubu	323,6 ^a \pm 20.11
Metformin Grubu	316,0 ^a \pm 17.66
EE/DRSP Grubu	308,5 ^{ab} \pm 26.57
Metformin + EE/DRSP Grubu	285,5 ^{bc} \pm 8.7

* Aynı harf ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Farklı harf ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).



Şekil 4.4. Grupların sıçan canlı ağırlıkları.

4.3. Serum FSH, LH, E2 ve Testosteron Konsantrasyonları

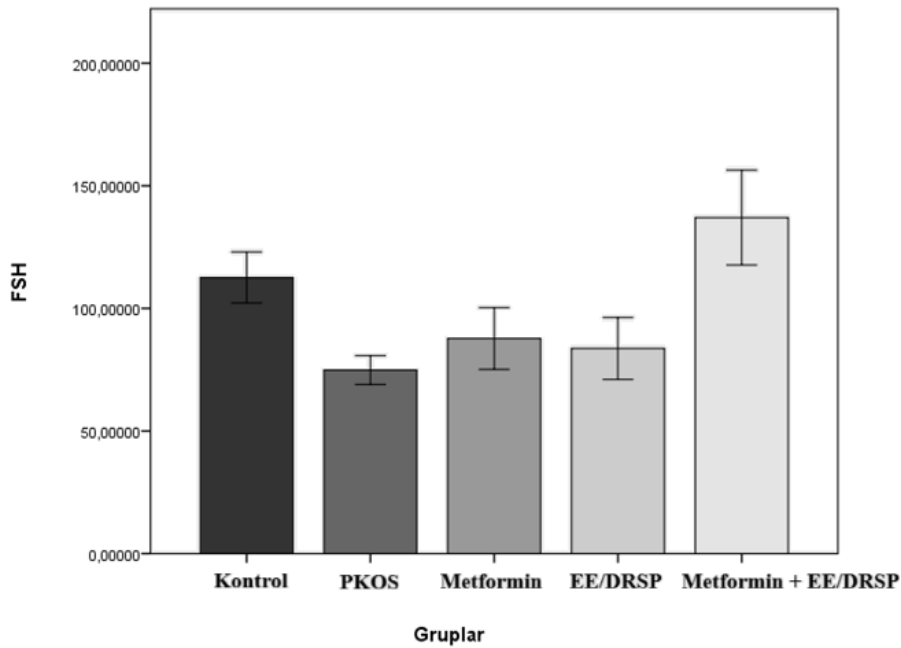
Deney sonunda tüm gruplara ait sıçanların serum FSH, LH, E2 ve Testosteron konsantrasyonları değerlendirildi. Deney sonunda tüm gruplara ait sıçanların serum FSH, LH, E2 ve testosteron konsantrasyonları ve istatistiksel analizleri Tablo 4.2 de sunuldu.

Tablo 4.2. Kontrol grubu, PKOS grubu ve tedavi gruplarına ait FSH, LH, E2 ve testosteron konsantrasyonları (ortalama \pm standart sapma).

	FSH (ng/mL)		LH (mIU/mL)		E2 (pg/mL)		Testosteron (ng/mL)	
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
Kontrol grubu	112,5826 ^b	9,91806	4,81288 ^b	1,95900	103,76627 ^a	30,32396	2,02630 ^b	0,50972
PKOS grubu	74,86750 ^c	5,56557	22,56727 ^a	3,79573	35,33290 ^b	19,98392	5,35855 ^a	0,55844
Metformin grubu	87,73243 ^c	11,98238	7,26212 ^b	2,22346	48,95793 ^b	12,99012	1,71763 ^b	0,31433
EE/DRSP grubu	83,66402 ^c	12,01862	5,70165 ^b	2,24164	49,26618 ^b	15,20941	2,09810 ^b	0,64236
Metformin + EE/DRSP grubu	137,04798 ^a	18,45317	5,00922 ^b	1,39757	85,33242 ^a	28,42650	1,70378 ^b	0,41044

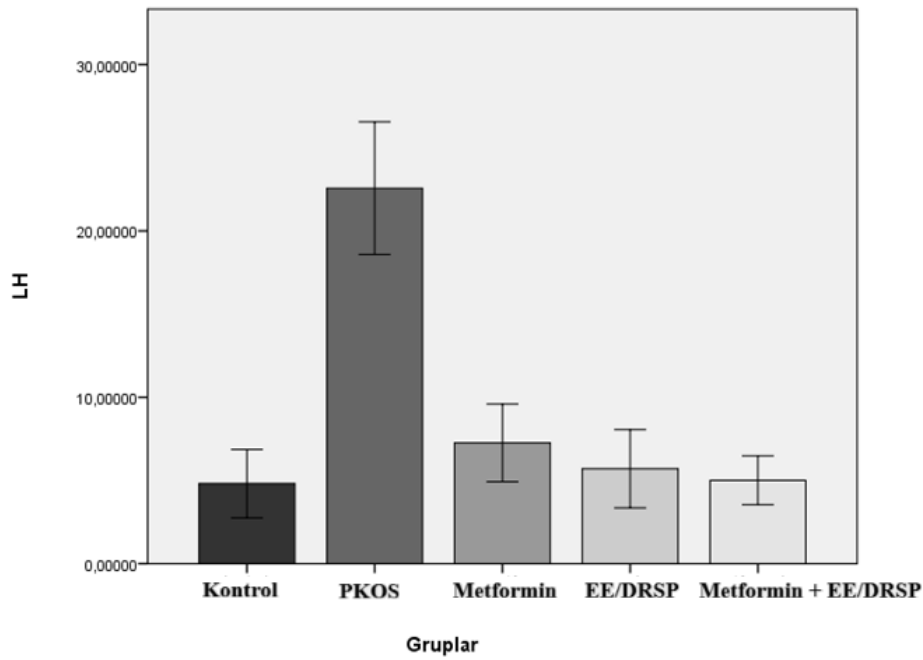
*Aynı harf ile gösterilen değerler arasında istatistiksel bir anlam bulunmamaktadır ($p>0,05$) Farklı harf ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

FSH konsantrasyonları incelendiğinde PKOS grubundaki FSH konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı tespit edildi. İstatistiksel olarak PKOS ve kontrol grupları arasında FSH konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$). Metformin grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunsa da ($p < 0,05$) metformin grubu ile PKOS grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuyordu ($p > 0,05$). EE/DRSP grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmakta olup ($p < 0,05$); EE/DRSP grubu ile PKOS grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuyordu ($p > 0,05$). Metformin+EE/DRSP kombine uygulanan grupta kontrol grubu ile grubunda anlamlı bir fark bulunuyordu ($p < 0,05$), bu anlamlı farklılık Metformin+EE/DRSP ile PKOS grubu arasında da tespit edildi ($p < 0,05$). Metformin+EE/DRSP grubunda FSH konsantrasyonunun PKOS grubuna göre belirgin ölçüde arttığı tespit edildi. Metformin ve EE/DRSP gruplarında FSH konsantrasyonunun PKOS grubuna göre arttığı, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit edildi. Tüm grupların FSH konsantrasyonlarına ait veriler Şekil 4.5 verilmiştir.



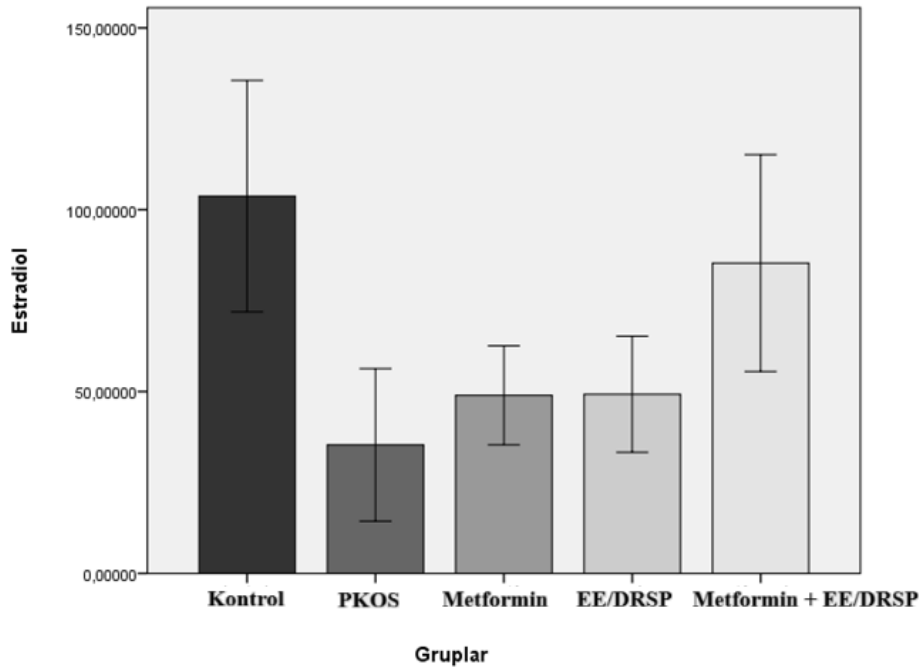
Şekil 4.5. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum FSH konsantrasyonları.

LH konsantrasyonları konsantrasyonlarına incelendiğinde PKOS grubunda kontrol grubuna göre belirgin ölçüde artış olduğu tespit edildi. İstatistiksel olarak PKOS ve kontrol grupları arasında LH konsantrasyonu anlamlı bir fark bulunmaktaydı ($p<0,05$). Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP gruplarının LH konsantrasyonlarının kontrol grubu ile benzer olduğu tespit edildi. Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP grupları arasında LH konsantrasyonun PKOS grubuna göre belirgin ölçüde azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi ($p<0,05$). Tüm grupların LH konsantrasyonlarına ait veriler Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum LH konsantrasyonları.

E2 konsantrasyonları incelendiğinde; PKOS grubunda E2 konsantrasyonunun kontrol grubuna göre belirgin ölçüde azaldığı tespit edildi. İstatistiksel olarak PKOS ve kontrol grupları arasında E2 konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0,05$) tespit edildi. Metformin grubunda kontrol grubuna göre E2 konsantrasyonlarında belirgin azalma olduğu ($p<0,05$), PKOS grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi ($p>0,05$). EE/DRSP grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmakta olup ($p<0,05$); EE/DRSP grubu ile PKOS grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuyordu ($p>0,05$). Metformin + EE/DRSP grubu ile PKOS grubu arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$) kontrol grubu ile arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Metformin + EE/DRSP grubunda E2 konsantrasyonunun PKOS grubuna göre belirgin ölçüde arttığı tespit edildi. Metformin ve EE/DRSP grupları E2 konsantrasyonunun PKOS grubuna göre arttığı ve Metformin ve EE/DRSP grupları konsantrasyonlarının benzer olduğu tespit edildi; bu artış bakımından her iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) tespit edildi. Tüm grupların E2 konsantrasyonlarına ait veriler Şekil 4.7 verilmiştir.

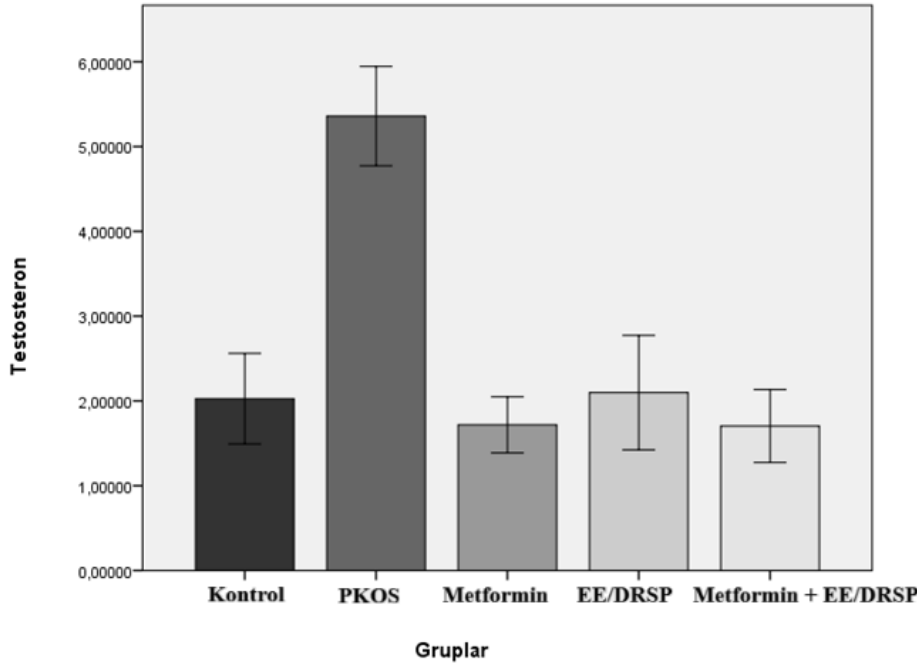


Şekil 4.7. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum E2 konsantrasyonları.

Testosteron konsantrasyonları incelendiğinde; PKOS grubunda testosteron konsantrasyonunun kontrol grubuna göre belirgin ölçüde artmıştı. PKOS grubu ve kontrol grupları arasında testosteron konsantrasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Metformin verilen grupta testosteron konsantrasyonları PKOS grubuna göre anlamlı derecede düşmüş ($p<0,05$); bu düşüş kontrol grubu seviyelerine indiğinden kontrol grubu ile anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

PKOS ve Metformin, EE/DRSP, Metformin + EE/DRSP grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$) tespit edildi. Bu tedavi gruplarında testosteron konsantrasyonunun PKOS grubuna göre belirgin ölçüde azaldığı tespit edildi.

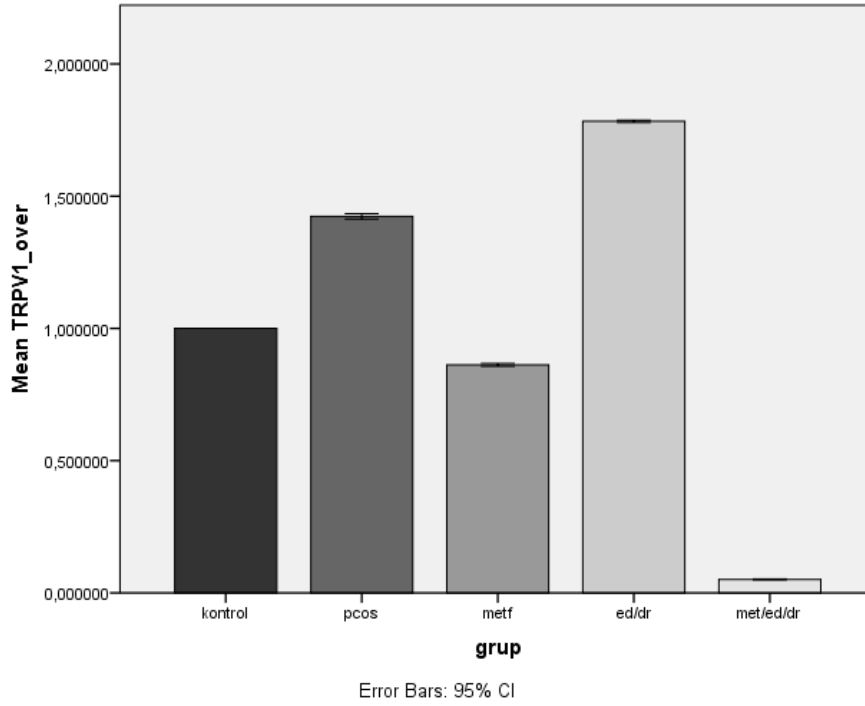
Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP gruplar testosteron konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$). PKOS grubuna göre anlamlı bir düşüş görüldüğü ($p<0,05$) her üç grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) testosteron seviyelerinin kontrol grubu düzeyine düştüğü gözlemlendi. Metformin grubu ve Metformin + EE/DRSP grubuna ait testosteron konsantrasyonlarının benzer olduğu, EE/DRSP grubunda ise testosteron konsantrasyonlarının diğer tedavi gruplarına göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Tüm grupların testosteron konsantrasyonlarına ait veriler Şekil 4.8 verilmiştir.



Şekil 4.8. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum testosteron konsantrasyonları.

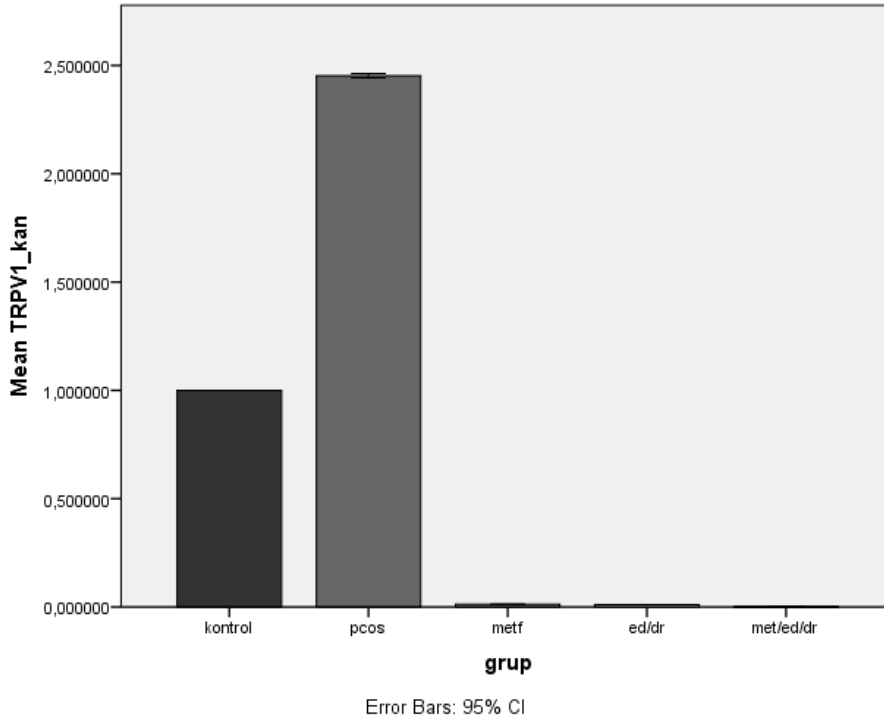
4.4. Kan ve Over Dokusunda *Trpv1* Gen Ekspresyonu

Real-time PCR analizi sonuçlarına göre over dokusunda *Trpv1* gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun 1,42 kat arttığı ($p<0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun 0,86 kat azaldığı ($p<0.001$); ED/DRSP grubunda 1,78 kat arttığı ve Metformin + ED/DRSP grubunda 0.051 kat azaldığı ($p<0.001$) gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum over dokusunda gen ekspresyon grafiği.

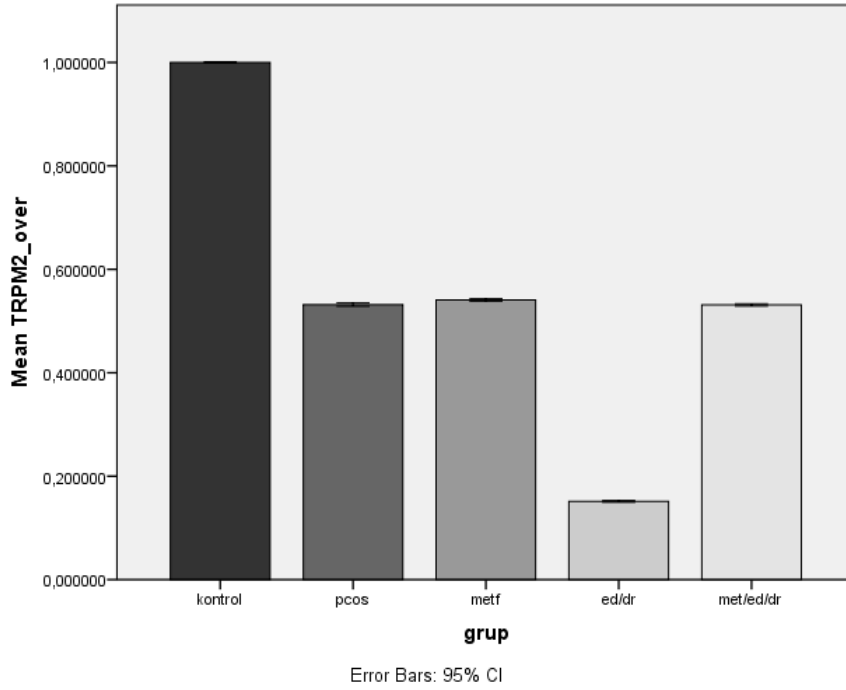
Real-time PCR analizi sonuçlarına göre kanda *Trpv1* gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun 2,45 kat arttığı ($p < 0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun 0,0121 kat azaldığı ($p < 0.001$); EE/DRSP grubunda 0,0111 kat azaldığı ve Metformin + EE/DRSP grubunda 0,00021 kat azaldığı ($p < 0.001$) gözlemlendi (Şekil 4.10). Metformin ve EE/DRSP gruplarında kanda anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ($p > 0,001$).



Şekil 4.10. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum kan dokusunda gen ekspresyon grafiği.

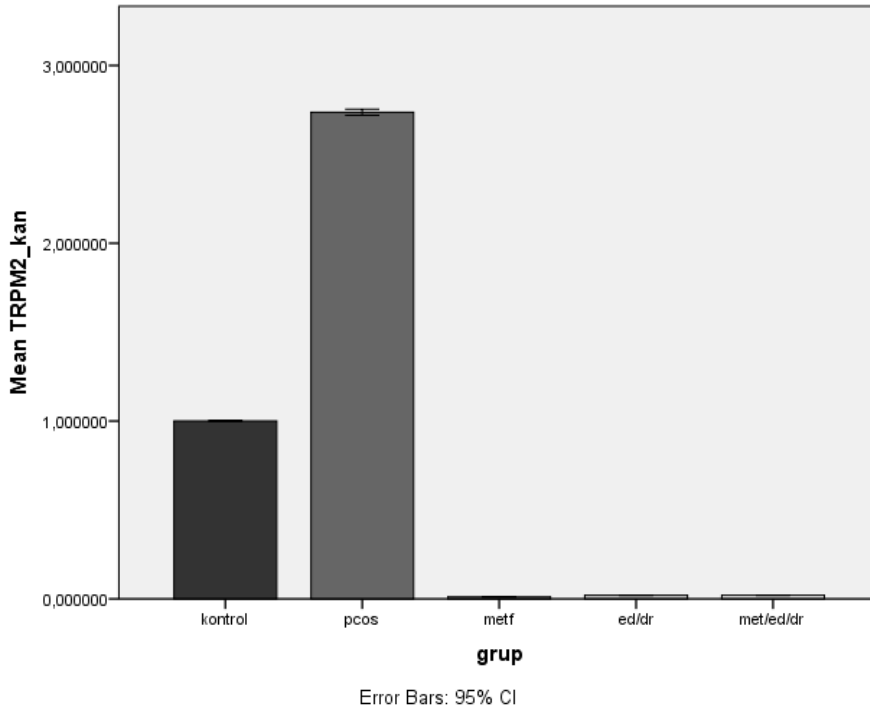
4.5. Kan ve Over Dokusunda *Trpm2* Gen Ekspresyonu

Real-time PCR analizi sonuçlarına göre over dokusunda *Trpm2* gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun 0,531 kat azaldığı ($p<0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun 0,540 kat azaldığı ($p<0.001$); EE/DRSP grubunda 0,151 kat azaldığı ve Metformin + EE/DRSP grubunda 0,531 kat azaldığı ($p<0.001$) gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum over dokusunda gen ekspresyon grafiği.

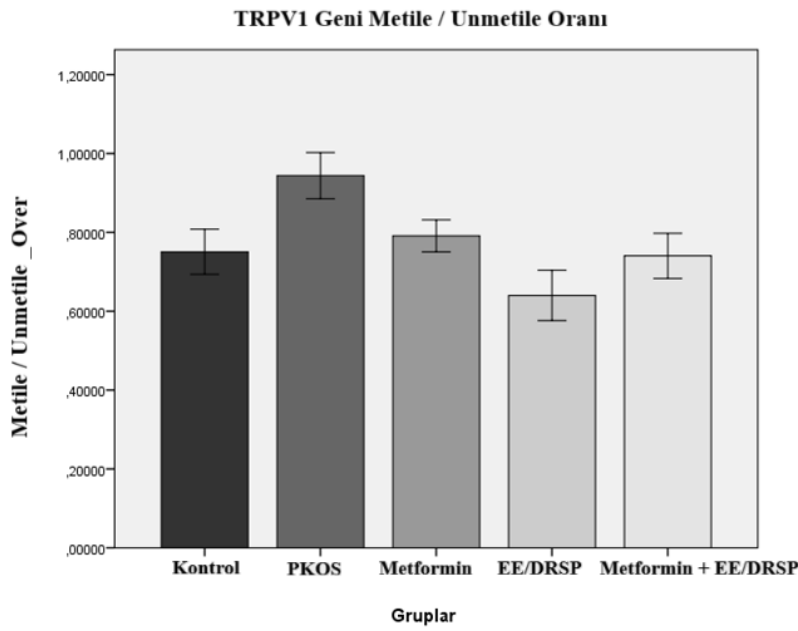
Real-time PCR analizi sonuçlarına göre kan dokusunda *Trpm2* gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun 2,73 kat arttığı ($p < 0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun 0,011 kat azaldığı ($p < 0.001$); EE/DRSP grubunda 0,0198 kat azaldığı ve Metformin + EE/DRSP grubunda 0,0201 kat azaldığı ($p < 0.001$) gözlemlendi (Şekil 4.12). Metformin, Metformin + EE/DRSP ve EE/DRSP gruplarında kanda anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ($p > 0,001$).



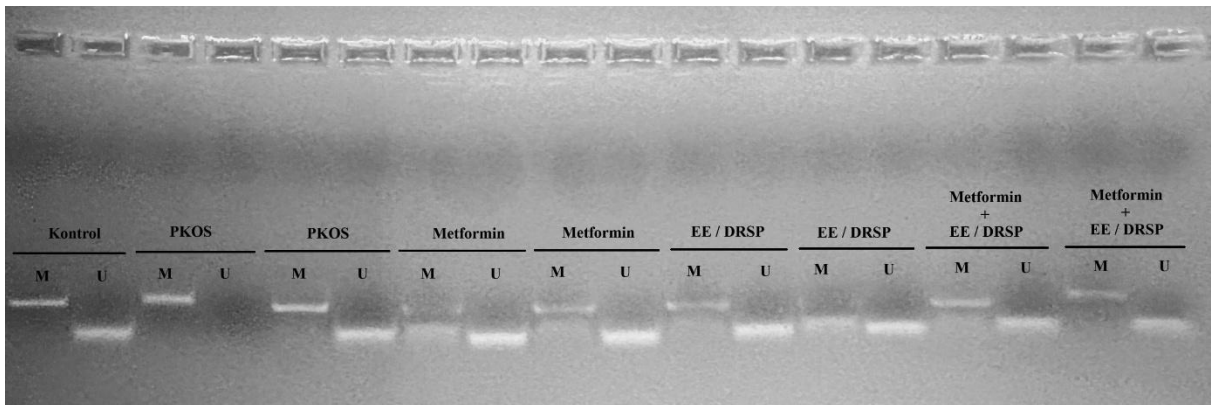
Şekil 4.12. Kontrol grubu, PKOS grubu, Metformin grubu, EE/DRSP grubu ve Metformin + EE/DRSP gruplarında serum kan dokusunda gen ekspresyon grafiği.

4.6. Kan ve Over Dokusunda *Trpv1* Promotör Metilasyonu

Metilasyon spesifik PCR analizi sonucuna göre *Trpv1* geninin over dokusunda promotör metilasyon profiline bakıldığında: PKOS grubunda kontrole kıyasla metilasyonun arttığı ($p<0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda metilasyonun azaldığı ($p<0.001$), EE/DRSP grubunda metilasyonun azaldığı ($p<0.001$), Metformin + EE/DRSP ($p<0.001$) grubunda metilasyonun azaldığı gözlemlenmiştir. Kontrol, Metformin ve Metformin + EE/DRSP grupları arasında metilasyonda anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,001$) (Şekil 4.13 ve 4.14).

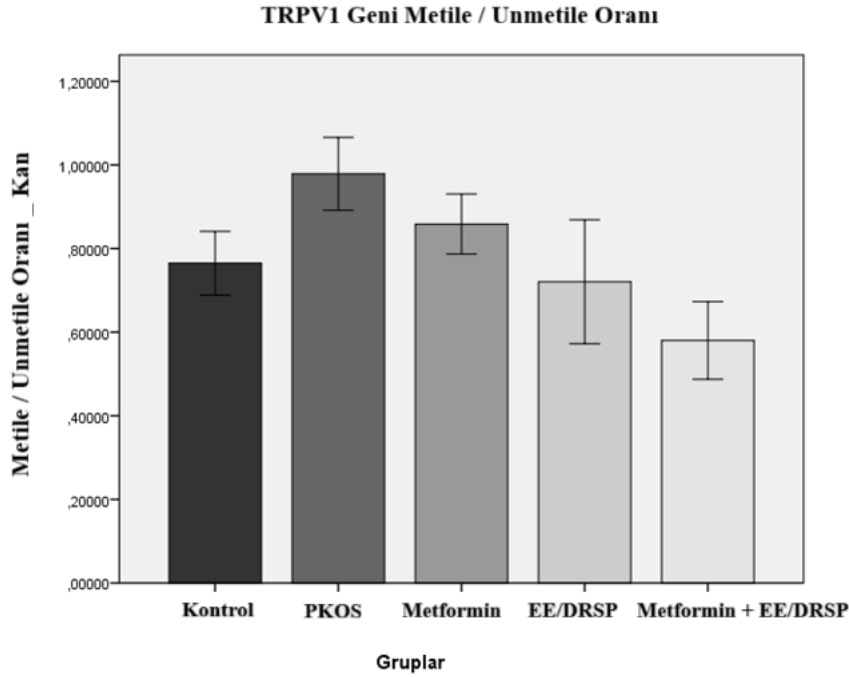


Şekil 4.13. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda *Trpv1* geninin promotör metilasyonun metile/ unmetile oranı.

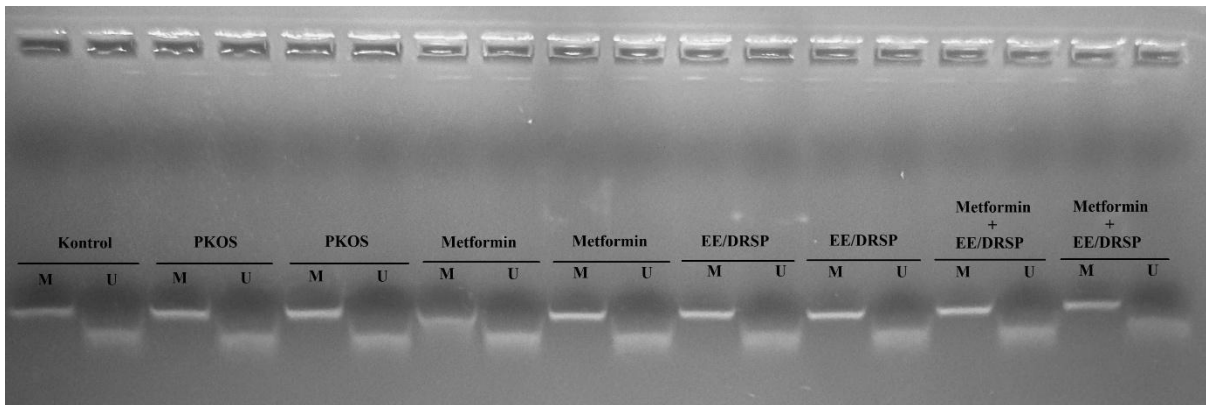


Şekil 4.14. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda *Trpv1* geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Metilasyon spesifik PCR analizi sonucuna göre *Trpv1* geninin kandaki promotör metilasyon profiline bakıldığında: PKOS grubunda kontrole kıyasla metilasyonun arttığı ($p<0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda metilasyonun azaldığı ($p<0.001$), EE/DRSP grubunda metilasyonun azaldığı ($p<0.001$), Metformin + EE/DRSP ($p<0.001$) grubunda metilasyonun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16)



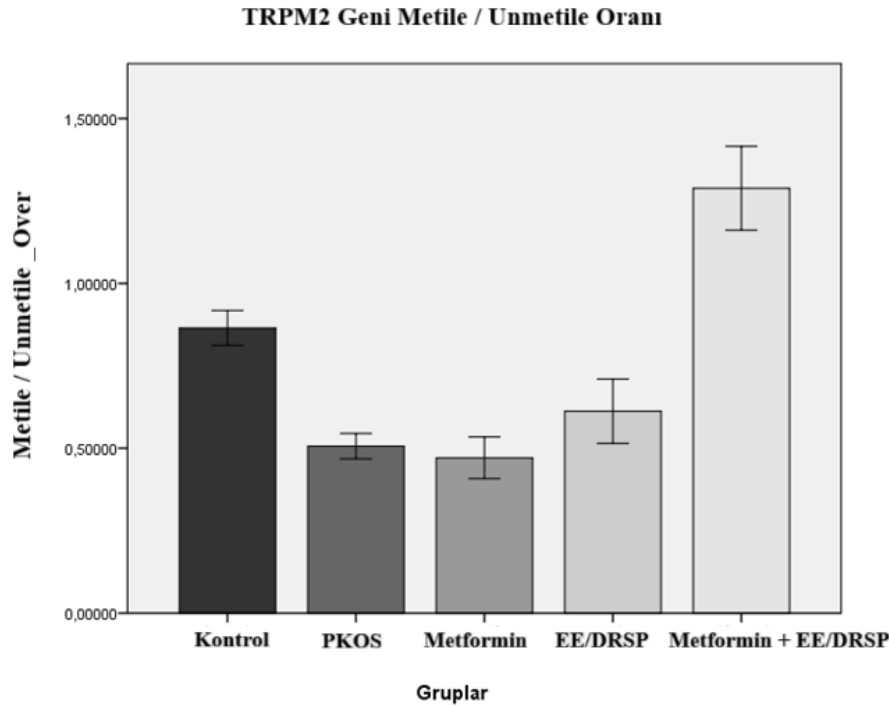
Şekil 4.15. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda *Trpv1* geninin promotör metilasyonunun metile/ unmetile oranı.



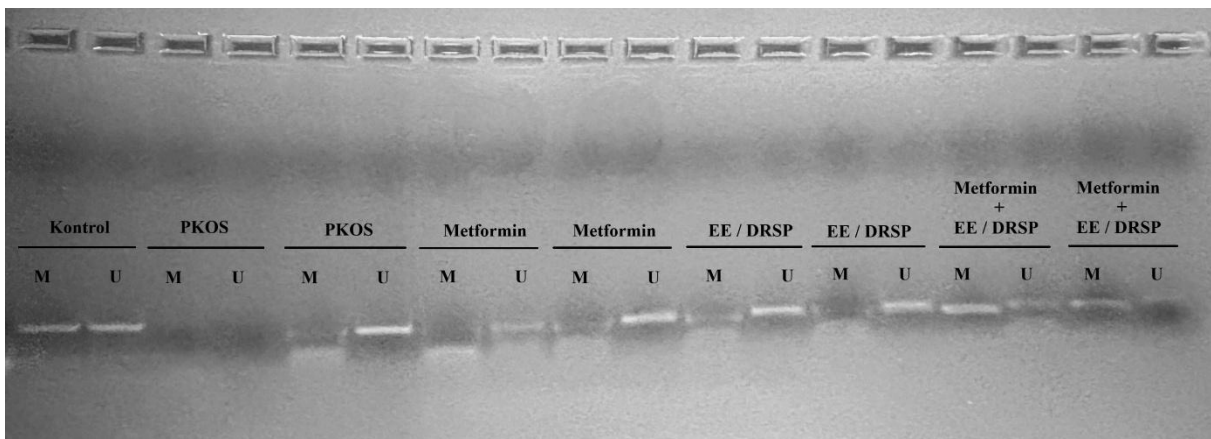
Şekil 4.16. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda *Trpv1* geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

4.7. Kan ve Over Dokusunda *Trpm2* Promotör Metilasyonu

Metilasyon spesifik PCR analizi sonucuna göre *Trpm2* geninin over dokusunda promotör metilasyon profiline bakıldığında: PKOS grubunda kontrole kıyasla metilasyonun azaldığı ($p<0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda metilasyonun azaldığı ($p<0.001$), EE/DRSP grubunda metilasyonun arttığı ($p<0.001$), Metformin + EE/DRSP ($p<0.001$) grubunda metilasyonun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17 ve 4.18).

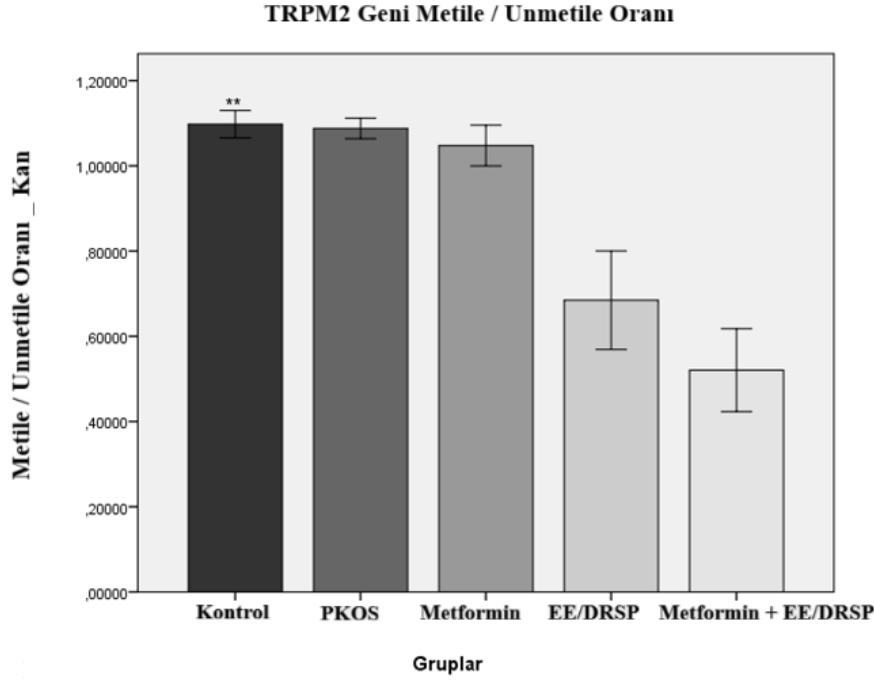


Şekil 4.17. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda *Trpm2* geninin promotör metilasyonun metile/ unmetile oranı.

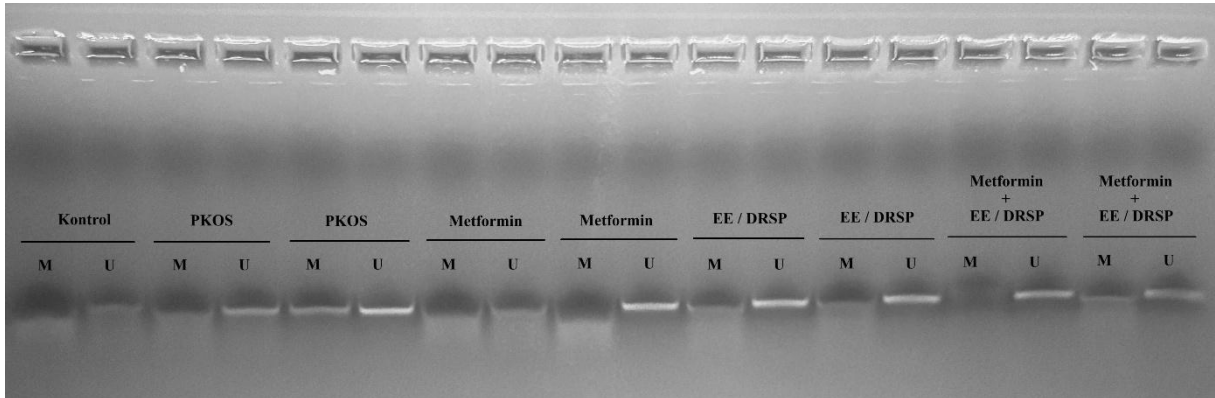


Şekil 4.18. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda *Trpm2* geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Metilasyon spesifik PCR analizi sonucuna göre *Trpm2* geninin kandaki promotör metilasyon profiline bakıldığında: PKOS grubunda kontrole kıyasla metilasyonun azaldığı ($p>0.001$) gözlemlendi. PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda metilasyonun azaldığı ($p>0.001$), EE/DRSP grubunda metilasyonun azaldığı ($p<0.001$), Metformin + EE/DRSP ($p<0.001$) grubunda metilasyonun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.19 ve 4.20).



Şekil 4.19. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS over dokusunda *Trpm2* geninin promotör metilasyonunun metile/ unmetile oranı.



Şekil 4.20. Metformin, EE/DRSP ve Metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS kan dokusunda *Trpm2* geninin promotör metilasyonuna etkisini gösteren metilasyon spesifik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

4.8. *Trpv1* ve *Trpm2* Genlerinin Over ve Kan Dokularında Promotör Metilasyon ile Ekspresyon İlişisine Ait Korelasyon

Trpv1 geninin over dokusunda promotör metilasyon ve ekspresyon arasındaki korelasyona bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun artarken, metilasyonun arttığı gözlemlendi ($r = 0.895^{**}$, $p=0.000$, $p<0.01$). PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun azalırken metilasyonun azaldığı ($r = 0.422$, $p=0.172$, $p>0.05$); EE/DRSP grubunda ekspresyon artarken metilasyonun azaldığı ($r = -0.727^{**}$, $p=0.007$, $p<0.01$); Metformin + EE/DRSP grubunda ekspresyon azalırken, metilasyonun azaldığı ($r = 0.870^{**}$, $p=0.000$, $p<0.01$) gözlemlendi.

Trpv1 geninin kan dokusunda promotör metilasyon ve ekspresyon arasındaki korelasyona bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun artarken metilasyonun arttığı gözlemlendi ($r = 0.834^{**}$, $p=0.001$, $p<0.01$). Metformin grubunda ekspresyonun azalırken metilasyonun azaldığı ($r = 0.588$, $p=0.044^{*}$, $p<0.05$); EE/DRSP grubunda ekspresyonun azalırken metilasyonun azaldığı ($r = 0.210$, $p=0.511$, $p>0.05$); Metformin + EE/DRSP grubunda azalırken metilasyonun azaldığı gözlemlendi ($r = 0.781^{**}$, $p=0.003$, $p<0.01$).

Trpm2 geninin over dokusunda promotör metilasyon ve ekspresyon arasındaki korelasyona bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun azalırken, metilasyonun azaldığı gözlemlendi ($r = 0.870^{**}$, $p=0.000$, $p<0.01$). PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun artarken metilasyonun azaldığı ($r = 0.0758^{**}$, $p=0.004$, $p<0.01$); EE/DRSP grubunda ekspresyon azalırken metilasyonun arttığı ($r = -0.780^{**}$, $p=0.003$, $p<0.01$); Metformin + EE/DRSP grubunda ekspresyon azalırken metilasyonun arttığı gözlemlendi ($r = -0.728$, $p=0.007$, $p<0.01$).

Trpm2 geninin kan dokusunda promotör metilasyon ve ekspresyon arasındaki korelasyona bakıldığında: PKOS grubunda kontrole göre ekspresyonun artarken metilasyonun azaldığı gözlemlendi ($r = -0.254$, $p=0.426$, $p>0.05$). PKOS grubu ile kıyaslandığında; Metformin grubunda ekspresyonun azalırken metilasyonun azaldığı ($r = 0.463$, $p=0.001$, $p>0.05$); EE/DRSP grubunda ekspresyon azalırken metilasyonun azaldığı ($r = 0.825^{**}$, $p=0.350$, $p<0.01$); Metformin + EE/DRSP grubunda ekspresyon azalırken metilasyonun ($r = 0.855^{**}$, $p=0.000$, $p<0.01$) azaldığı gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda ratlarda oluşturduğumuz deneysel PKOS modelinde; deney grubunda ve tedavi uygulanan gruplarda *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının metilasyon ve ekspresyon düzeylerinde olası değişimler araştırılmıştır. Elde ettiğimiz verilerle, PKOS modelinde *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının epigenetik ve transkripsiyonel düzenlenmesinde belirgin değişiklikler olduğu gözlenmiştir; PKOS tedavisinde sıklıkla kullanılan Metformin, EE/DRSP ve bunların kombinasyon uygulamalarının moleküler parametreler üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. PKOS grubunda her iki genin ekspresyon ve metilasyon düzeylerinde PKOS fizyopatolojisiyle uyumlu yönde değişimler izlenirken, tedavi uygulamalarının gen ve dokuya özgü farklı etkiler gösterdiği belirlenmiştir.

Hormon düzeylerindeki gözlenen değişimler ve vajinal smear analizleri ile ratlara uyguladığımız Letrozol ile hedeflenen *in vivo* PKOS modelinin oluştuğu doğrulanmıştır. PKOS oluşturulan ratlarda LH ve testosteron konsantrasyonlarının artması ve FSH konsantrasyonlarının azalması gibi endokrin değişiklikler, insan PKOS'unda görülen hormonal profile benzer bir modelin oluştuğunu desteklemektedir. (Khosrowpour ve ark., 2022; Moradi ve ark., 2021).

Çalışmamızda Letrozol ile indüklenen *in vivo* PKOS modelinde ratların vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu, PKOS'ta gözlenen yüksek lipid birikimi ve hafif glukoz intoleransını içeren anabolik etki ile ilişkili olabileceği gibi, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak overde çok sayıda kist oluşumu ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. (Kelley ve ark., 2016; Ndeingang ve ark., 2019)- Buna karşılık, ilaç uygulanan tedavi gruplarında PKOS grubuna kıyasla vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. B. Xu ve ark. (2022) yaptıkları bir çalışmada, PKOS grubunun vücut ağırlığının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu ve PKOS modeline 21 gün oral metformin uygulandıktan sonra, PKOS + MET grubunda vücut ağırlığının PKOS grubuna göre azaldığı rapor edilmiştir. Bu bulgular ile çalışmamızın bulguları paralellik göstermektedir.

Östrus döngüsü, esas olarak ovaryum fonksiyonunu düzenleyen cinsiyet hormonlarındaki değişiklikler nedeniyle PKOS'lu sıçanlarda düzensiz hale gelmektedir (Sun ve ark., 2013). Çalışmamızda kontrol grubunda 21 günlük serum fizyolojik uygulaması sonunda düzenli siklus görülürken, PKOS'lu sıçanlar uzamış düzensiz östrus siklusu

göstermiştir. Rajen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ve benzer şekilde H. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada letrozol ile indüklenen PKOS'un dişi sıçanlarda uzamış östrus döngüsü ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Rajan ve ark., 2017; H. Yang ve ark., 2018).

PKOS, cinsiyet hormon düzeylerinden özellikle testosteron, LH ve E2 düzeylerinde değişimlerle karakterize bir sendromdur (Ndeingang ve ark., 2019). Artmış serum testosteron ve LH konsantrasyonları ile buna eşlik eden düşük E2, progesteron ve FSH seviyeleri PKOS tablosunu oluşturan cinsiyet hormonlarındaki değişimlerdir. Çalışmamızda da PKOS modeli oluşturduğumuz ratlarda kontrol grubuna göre LH ve testosteron konsantrasyonlarında anlamlı bir artış, FSH ve E2 konsantrasyonlarında ise anlamlı bir azalma olduğu; ayrıca bu ratların alınan vajinal smear örneklerinde düzensiz ve uzamış östrus siklusu gözlenmiştir. PKOS modeli oluşturduğumuz ratların over dokularının morfolojik incelemesinde kistik yapıların olduğu gözlenmiştir. Tüm bu veriler, PKOS modeli oluşturulmasında kullanılan doz ve sürede letrozolün etkinliğini doğrulamaktadır. M. X. Wang ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada, letrozol ve yüksek yağlı diyet ile indüklenen PKOS-IR modelindeki sıçanlarda FSH düzeyinde anlamlı azalma, LH ve testosteron konsantrasyonlarında ise anlamlı artma olduğunu bildirilmiştir. Bu veriler çalışma bulgularımızla paralellik göstermekte ve hormonal dengesizliğin PKOS patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını desteklemektedir. Başka bir çalışmada Khosrowpour ve ark. (2022) letrozol ile indüklenen PKOS modelinde kontrol grubuna kıyasla yüksek LH ve testosteron seviyeleri, düşük E2 ve progesteron konsantrasyonları tespit etmişlerdir (Khosrowpour ve ark., 2022).

Çalışmamızda PKOS grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalan FSH konsantrasyonlarının metformin ve EE/DRSP uygulamasının yapıldığı gruplarda FSH konsantrasyonlarında düzelmeler sağladığı; metformin ile EE/DRSP uygulanan kombine tedavinin FSH konsantrasyonları açısından PKOS tablosunda belirgin iyileşmeye sebep olduğu görülmektedir. E2 konsantrasyonlarının PKOS grubuna kıyasla Metformin grubu ve EE/DRSP gruplarında arttığı ancak anlamlı bir fark oluşmadığı; oysa Metformin + EE/DRSP verilen kombine tedavinin E2 konsantrasyonlarını PKOS grubuna göre anlamlı ölçüde yükselttiği görülmüştür.

Testosteron konsantrasyonlarının PKOS grubuna kıyasla metformin, EE/DRSP ve metformin + EE/DRSP gruplarında azaldığı fakat en belirgin düşüşü metformin + EE/DRSP kombine tedavinin sağladığı gözlenmiştir. Tedavinin olumlu etkisi açısından üç tedavinin de benzer etkiler gösterdiği izlenmiştir.

Xu ve ark., (2022),—PKOS rat modelinde metformin uygulanan grupta E2 konsantrasyonlarının PKOS grubuna göre arttığını, testosteron konsantrasyonlarının ise azaldığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise Rabah ve ark. (2023), PKOS-IR sıçan modelinde, metformin grubunda E2 ve FSH konsantrasyonlarının PKOS grubuna kıyasla arttığını, LH ve testosteron konsantrasyonlarının azaldığını rapor etmişlerdir. Bu bulgular çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. PKOS grubundaki serum hormon konsantrasyonları, PKOS'ta hormonal bozuklukların meydana geldiğini, buna karşın metformin tedavisinin söz konusu hormonal düzensizlikleri düzenleyici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Literatürde PKOS sıçan modeli üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, metforminin bu modelde yaygın olarak kullanılan bir ilaç olduğu görülmektedir. Ancak EE/DRSP ile metformin + EE/DRSP kombinasyonlarının PKOS sıçan modeli üzerindeki etkilerini araştıran deneysel çalışma bulunmamaktadır. Mevcut verilerin büyük çoğunluğunu insanlar üzerinde gerçekleştirilen randomize klinik çalışmalar oluşturmaktadır. Bu nedenle, söz konusu ilaçlarla yürütülen bu çalışmamız, özgünlük açısından literatürde ilk deneysel verileri sunmaktadır. L. Li ve ark. (2020)'nin çalışmasında, PKOS hastalarında LH konsantrasyonlarının EE/DRSP tedavisi sonrası azaldığı; FSH konsantrasyonlarının EE/DRSP tedavisi sonrası arttığı; testosteron konsantrasyonlarının EE/DRSP tedavisi sonrası azaldığı rapor edilmiştir. Bu bulguların çalışmamızda EE/DRSP ile tedavi edilen PKOS modeli sonuçlarıyla uyumlu olduğu ve metformin + EE/DRSP kombinasyon tedavisinde daha belirgin bir iyileşme olduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, PKOS hastalarında EE/DRSP ve metformin + EE/DRSP tedavileri sonrasında FSH, LH ve testosteron konsantrasyonlarında azalma; E2 konsantrasyonlarında EE/DRSP tedavisi sonrasında azalma olduğu, kombinasyon tedavisinde ise artış olduğu gözlenmiştir, ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Kaya ve ark., 2012). Çalışmamızda ise PKOS sıçan modelinde EE/DRSP tedavisi FSH ve E2 konsantrasyonlarında artış, metformin+EE/DRSP tedavisi LH ve testosteron konsantrasyonlarında anlamlı azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Literatürdeki farklılıkların klinik çalışmalardaki insan popülasyonu ile deneysel hayvan modelleri arasında fizyolojik, metabolik ve endokrin yanıt farklılıklarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca ilaç biyoyararlanımı, doz uygulaması, tedavi süresinin de hormon yanıtlarını etkileyebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Trpv1 ve *Trpm2*'nin kan dokusunda artmış ekspresyonu, PKOS'un bilinen inflamatuvar ve oksidatif stres komponentleri ile uyumludur. Bu iyon kanalları hücrel stres sensörleri olarak görev yapmakta; artmış reaktif oksijen türleri, inflamatuvar sitokinler ve metabolik yük altında aktive olmaktadır. Dolayısıyla PKOS modelinde görülen sistemik inflamasyon, dolaşımında hem *Trpv1* hem *Trpm2* ekspresyon artışı şeklinde yansımaktadır. Tedavi gruplarında ekspresyonun kontrol düzeyinin altına düşmesi yani downregülasyonu, hem metabolik stresin (Metformin) hem hormonal baskının (EE/DRSP) bu kanal aktivitesini sistemik olarak gerilettiğini göstermektedir.

Kan dokusunda metilasyon paternleri değerlendirildiğinde PKOS modelinde klasik baskılayıcı metilasyon modelinin tersine metilasyonda artış (*Trpv1*) ve anlamlı değişim olmaması (*Trpm2*) söz konusudur. Bu durum mRNA düzeyindeki artışın promotör bölge metilasyonlarına bağlı olarak değil de PKOS'a özgü oksidatif stres eşliğinde gelişen epigenetik adaptasyon ile açıklanabilir. Epigenetik düzenlemenin çok katmanlı olması ve dokuya özgü farklılıklar gösterebilmesi doğal bir durumdur. Promotor metilasyonu çoğu zaman transkripsiyon baskılanmasıyla ilişkilendirilse de özellikle inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili *Trpv1* ve *Trpm2* gibi iyon kanalı genlerinde bu ilişki doğrusal olmamaktadır. Gen ekspresyonu yalnızca DNA metilasyonu ile değil; histon modifikasyonları, enhancer aktivitesi, hormon düzeyleri, stres yanıtı ve post-transkripsiyonel mekanizmalar tarafından eş zamanlı olarak kontrol edilmektedir. Bu nedenle promotör metilasyonundaki artışın gen ekspresyonundaki artışla veya azalmanın ekspresyon azalmasıyla paralel olmaması beklenebilir bir durumdur.

Ayrıca kan ve over dokusunun farklı hücrel yapıları ve epigenetik imzaları nedeniyle aynı genin iki dokuda tamamen farklı düzenlenmesi biyolojik olarak olağan karşılanmaktadır. PKOS'un yarattığı inflamatuvar ortam, bazı dokularda ekspresyonu metilasyondan bağımsız olarak yükseltirken, diğer dokularda epigenetik baskılanmayı artırabilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada görülen metilasyon–ekspresyon uyumsuzluğu bir metodolojik tutarsızlık değil; PKOS'un dokuya özgü, çok katmanlı ve kompleks epigenetik düzenlenmesine ait tipik bir yansıma olarak değerlendirilmelidir. Promotör bölge metilasyonları gen ekspresyon seviyelerinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, biyokimyasal ve morfolojik düzelmeye eşlik eden bir yönde değiştiği görülmektedir. Özellikle kombine tedavilerin metilasyon durumu PKOS modelinden anlamlı derecede farklılık göstermektedir. *Trpv1* geni promotör bölgesindeki metilasyon azalması ve *Trpm2* promotör bölgesindeki metilasyon artışı kan

dokusunda normale dönüşün göstergelerinden biridir. Kan dokusunda genel olarak bakıldığında promotör bölge metilasyon oranları ile gen ekspresyon seviyeleri ilişkili görünmese de hem PKOS modeli hem de tedavi gruplarının hücrelerde meydana gelen stresi yönetme doğrultusunda metilasyon paterni ve ekspresyon seviyesi ortaya koyduğu görülmektedir. Benzer şekilde over dokusunda da ilgili genlerin promotör bölge metilasyon oranları ve gen ekspresyonlarının ilişkili olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, söz konusu genlerin ekspresyonunun promotör bölge metilasyonundan ziyade diğer epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlendiğini göstermektedir.

Trpv1 gen ifadesi kontrole göre PKOS modelinde artış gösterirken metformin tedavisiyle kontrolün altına düşmüş, metformin + EE/DRSP tedavisinde ise belirgin bir şekilde downregüle olmuştur. EE/DRSP tedavisinde önemli bir farklılık gözlenmiştir ve bu durum, hormon tedavisinin over dokusunda belirgin değişikliklere yol açabileceğini düşündürmektedir. EE/DRSP tedavisiyle *Trpv1* gen ifadesinin hem kontrolden hem de PKOS modelinden anlamlı düzeyde yüksek çıkması hormonal tedaviye verilen cevap olarak anlamlandırılabilir. Bu durumun tam tersine *Trpm2* gen ifadesi kontrole göre aralarında anlamlı bir fark olmamak üzere hem PKOS hem metformin hem de metformin + EE/DRSP tedavisinde düşük düzeyde kalmıştır EE/DRSP tedavisinde ise tüm gruplardan anlamlı ölçüde downregüle olmuştur. EE/DRSP tedavisi ile *Trpv1* gen ifadesinde belirgin artış ve *Trpm2* gen ifadesindeki belirgin düşüş göstermesi tedavinin bu kanal proteinlerinin dahil olduğu bir mekanizmayla dokuda iyileşmenin sağlanmasına katkı verdiği bulgusunu karşımıza çıkarmaktadır. Gen ekspresyonları üzerinde etkisi olmadığını düşündüğümüz metilasyon paternleri ise doku iyileşmesiyle korelasyon göstermekte ve bağımsız bir indikatör olarak karşımıza çıkmaktadır.

Metforminin nöropatik ağrı (Hacimuftuoglu ve ark., 2020), inflamatuvar ağrı (Russe ve ark., 2013) ve viseral ağrı (Nozu ve ark., 2019) üzerinde analjezik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, *Trpv1* olarak bilinen seçici olmayan katyon kanalı da H⁺ iyonları tarafından aktive edilebilmektedir (Elokely ve ark., 2016; Wu ve ark., 2019; Rosenberger ve ark., 2020). *Trpv1*, dorsal kök ganglionlarında yüksek düzeyde eksprese edilmekte olup farklı ağrı durumlarındaki rolü iyi şekilde belgelenmiştir (Sondermann ve ark., 2019). Özellikle inflamasyon ve inflamatuvar ağrı, *Trpv1*'in önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Joseph ve ark., 2019). Bu nedenle, metforminin PKOS ağrısı üzerindeki analjezik etkisinde *Trpv1*'in rol alabileceği düşünülmektedir. *Trpm2*, oksidatif strese duyarlı

kalsiyum geçirgen bir iyon kanalı olup hücrel redoks dengesindeki değişikliklere yanıt olarak aktive olmaktadır (Chen ve ark., 2020). PKOS artmış oksidatif stres ve inflamasyonun *Trpm2* aktivasyonunu artırarak hücre içi Ca^{2+} dengesinin bozulmasına katkıda bulunabileceği düşünölmektedir. Metformin ise AMPK yolunu aktive ederek oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtı azaltabilen bir ajandır (Hasanvand, 2022). Bu nedenle metforminin reaktif oksijen türlerini azaltması yoluyla *Trpm2* kanal aktivitesini dolaylı olarak modöle edebileceği ve bu mekanizmanın PKOS ile ilişkili hücrel ve metabolik düzensizliklerin iyileştirilmesine katkı sağlayabileceği öne sürölmektedir.

Zhou ve ark. (2024) tarafından yapılan bir çalışmada, kemik kanseri sıçan modelinde metforminin kemik kanseri ağrısını hafiflettiği ve *Tgfb1-Tgfbri-Trpv1* yolunun baskılandığı ortaya konmuştur. Qian ve ark. (2021) çalışması da benzer sonuçlar göstermekte olup, *Trpv1* yolunun baskılandığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalar farklı hastalık modellerinde gerçekleştirilmiş olsa da *Trp* iyon kanalları ve *Tgf-B* aracılı sinyal yollarının inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili olması nedeniyle bu mekanizmaların PKOS patogeneğinde de rol oynayabileceği düşünölmektedir. Metforminin yalnızca glukoz metabolizması üzerine değil, aynı zamanda inflamasyon, oksidatif stres ve iyon kanal regölasyonu üzerine de etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çok yönlü etkiler, metforminin PKOS tedavisinde gözlenen faydalarının altında yatan moleköl mekanizmaların *Trp* iyon kanalları üzerinden gerçekleşebileceğini düşöndürmektedir. Çalışmamızda PKOS modelinde *Trpv1* ekspresyon düzeylerinin metformin tedavi grubunda baskılandığı tespit edilmiş olup, bu bulgular literatürdeki diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Diyabetik rat modelinde yapılan bir çalışmada ise atriyumda *KCa2.2* ekspresyonunun azaldığı ve *KCa2.3* ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir. Metformin tedavisinin diyabete bağlı atriyal küçük iletkenliğe sahip kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının ekspresyonundaki değişiklikleri tersine çevirdiği bildirilmiştir (X. Fu ve ark., 2018). Diyabet ve PKOS'un ortak patofizyolojik özellikler arasında insölin direnci ve metabolik stres yer aldığından, metforminin iyon kanalları üzerindeki düzenleyici etkilerinin PKOS dokularında da görölebileceği düşünölmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda PKOS modelinde over dokusunda *Trpv1* ekspresyonunun arttığı, *Trpm2* ekspresyonunun ise azaldığı; metformin tedavisinin bu *Trp* iyon kanallarının ekspresyonunu modöle ettiği gözlenmiştir. Bu bulgularımız literatürde metforminin iyon kanalları üzerindeki düzenleyici etkilerini bildiren çalışmalarla uyumludur.

Kronik ağrı modeli oluşturulan dişi ratların trigeminal sinirindeki *Trpv1* gen ekspresyonunun analizinde, metformin ile tedavi edilen grupta, kontrol grubuna kıyasla *Trpv1* kanal ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (Santos ve ark., 2024). Yapılan çalışmalar, inflamasyonun periferik ve merkezi sinir sisteminde ağrı durumunun gelişimi ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Watkins ve ark., 2023). PKOS patogenezinde inflamasyon, oksidatif stres ve metabolik disfonksiyonun önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kronik sistemik inflamasyon ile ağrı duyarlılığı arasındaki ilişkinin kronik ağrının gelişimi ve devamında yüksek derecede etkili olduğu bildirilmiştir. PKOS'lu hastalarda artmış ROS birikimi, ağrının gelişimi ve sürdürülmesinde rol oynayabilir (Lu ve ark., 2022). Bu nedenle proinflamatuvar ve oksidatif stres PKOS'lu hastalarda ağrı algısına katkıda bulunabilmektedir. Çalışmamızda ise PKOS'ta gözlenen artmış ekspresyon düzeylerinin metformin tedavi modelinde baskılanması benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde çalışmamızda da PKOS modelinde artmış *Trpv1* ekspresyonunun metformin tedavisi ile baskılandığı gözlenmiş olup, bu durum metforminin farklı patolojik durumlarda *Trp* kanalları üzerinde ortak düzenleyici etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir. *Trp* iyon kanallarının bu süreçlerde yer alması, bu kanalların PKOS patofizyolojisinde potansiyel moleküler hedefler olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada, kültüre edilmiş insan endometriyal epitel hücrelerinde *Trpm2* mRNA ekspresyonunun 17β -östradiol ile arttığı belirlenmiş olup, bu durumun *Trpm2*'nin östrojene duyarlı bir gen olduğunu göstermiştir (Hiroi ve ark., 2013). Çalışmamızda *Trpm2* gen ekspresyon düzeyleri, PKOS grubunda ve EE/DRSP grubunda azaldığı gözlenmiştir. EE/DRSP tedavisine karşın *Trpm2* gen ekspresyonundaki azalmanın devam etmesi, söz konusu tedavinin *Trpm2* regülasyonunu yeniden düzenlemek için yeterli olmayabileceğini veya bu regülasyon sürecinde farklı transkripsiyon faktörleri ile hücre içi sinyal yollarının etkili olabileceğini düşündürmektedir. *Trpm2* gen ekspresyonunun hormonal yanıtın değerlendirilmesinde potansiyel bir biyobelirteç olabileceği, ancak fizyopatolojik koşullar altında regülasyonunun kompleks mekanizmalar tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir.

Seksüel matür ratlarda *Trpa1* ve *Trpv1* mRNA düzeylerinin dietilstilbestrol tedavisi sonrasında anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir. *Trpa1* tedavi sonrası artış gösterirken, *Trpv1* kombinasyon tedavisinde değişim gözlenmediği bildirilmiştir. Seksüel olarak immatür ratlarda dietilstilbestrol tedavisinin her iki kanalın mRNA ekspresyonunda artışa neden

olduğu bildirilmiştir (Pohoczky ve ark., 2016). Çalışmamızda over dokusunda *Trpv1* gen ekspresyon düzeylerinin PKOS grubunda arttığı, metformin + EE/DRSP grubunda kombinasyon tedavi sonrası ekspresyonun baskılandığı gözlenmiştir. *Trpm2* gen ekspresyon düzeylerinde ise tedavi sonrasında EE/DRSP ve metformin + EE/DRSP grubunda anlamlı değişim gözlenmemiştir. Her iki çalışmada da hormonal ve kombine tedaviler sonucunda iyon kanallarının ekspresyon düzeyleri farklılıklar göstermiştir. Bu sonuçlar, klinikte kullanılan sentetik östrojen ve progesteron analoglarının birlikte uygulandığında, tek başlarına uygulamalarından farklı özgün tedavi profilleri oluşturduklarını vurgulamaktadır.

PKOS oluşturulmuş sıçan modelinde inflamasyonun artması ve kollajen birikiminin değişmesi ile kutanöz epitel rejenerasyonunun gecikmesi, *Trpv1*'in bu süreçte rol oynadığını göstermektedir (Zholos, 2011). Ayrıca, PKOS'lu bireylerde nötrofillerde *Trpv1* aktivasyonunun, kalsiyum girişine bağlı nötrofil aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin salınımını etkilediği düşünülebilir (Knowlton ve ark., 2011). Yapılan başka bir çalışmada, N-asetil sistein tedavisi ile nötrofillerde lipid peroksidasyonu, sitozolik reaktif oksijen türleri üretimi ve mitokondriyal membran depolarizasyonu değerlerinin azaldığı gösterilmiştir. Serum lipid peroksidasyonu, LH ve testosteron düzeylerinin N-asetil sistein tedavisi ile azaldığı bildirilmiştir (Köse ve Nazıroğlu, 2015). N-asetil sisteinin, oksidatif stresi ve *Trpv1* kanalı üzerinden Ca^{2+} girişini azaltması; oksidatif stres ve *Trpv1* kanalının PKOS etiolojisinde önemli bir role sahip olduğunu desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde *Trpv1* gen ifadesi, kontrole göre PKOS modelinde artış gösterirken, metformin tedavisiyle azalma, metformin + EE/DRSP tedavisi ile de belirgin bir şekilde azalma göstermiştir. Bu bulgular, uyguladığımız tedavi protokollerinin *Trpv1* kanalları üzerinden Ca^{2+} girişini düzenleyebileceğini düşündürmektedir. Bu durumun tam tersine *Trpm2* gen ifadesi hem PKOS hem metformin hem de metformin + EE/DRSP tedavisinde düşük düzeyde kalmıştır. Bu bulgular kombine tedavinin Ca^{2+} girişini azaltarak oksidatif stresin kontrol altına alınmasında terapötik katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Köse ve Nazıroğlu'nun diğer bir çalışmasında ise, PKOS hastalarında selenyumun, nötrofil *Trpv1* kalsiyum kanallarının modülasyonu yoluyla oksidatif strese ve Ca^{2+} girişine karşı koruyucu etki sağladığı ileri sürülmüştür (Köse ve Nazıroğlu, 2016). Çalışmamızda, over dokusunda *Trpv1* gen ifadesinin PKOS modelinde kontrol grubuna kıyasla arttığı, metformin tedavisiyle kontrol düzeyinin altına düştüğü ve metformin + EE/DRSP kombinasyonunda belirgin şekilde baskılandığı gözlenmiştir. EE/DRSP tedavisinde *Trpv1*

gen ekspresyonunun hem kontrolden hem de PKOS modelinden anlamlı düzeyde yüksek bulunması, hormonal tedavinin over dokusunda güçlü ve farklı yanıtlar oluşturabileceğini göstermektedir. Bu durum, PKOS patofizyolojisinde *Trpv1* kanallarının önemli bir düzenleyici role sahip olabileceğine işaret etmektedir.

García-Gómez ve arkadaşlarının (2023) yaptıkları çalışmada PKOS'lu bireylerin endometrium dokusunda, kontrol grubuna kıyasla *Hoxa10*, *Gab1* ve *Slc2a4* genlerinin ekspresyon düzeylerinin azaldığı ve *Hoxa10* promotör bölgesinde DNA metilasyon düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Metformin ve ve karbonhidrat kontrollü diyet uygulaması PKOS'lu bireylerin endometrium dokusunda *Hoxa10*, *Gab1* ve *Slc2a4* genlerinin ekspresyonunun arttığı ve *Hoxa10* promotör bölgesindeki DNA metilasyon seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre metformin ve ve karbonhidrat kontrollü diyet uygulamasının *Hoxa10* gen promotöründeki DNA metilasyonunun modülasyonu ve endometrial reseptivite ile insülin sinyal yollarında rol alan genlerin ekspresyonunun düzenleyerek PKOS hastalarında endometrial fonksiyonu iyileştirebileceği rapor edilmiştir (García-Gómez ve ark., 2023). Amani Abkenari ve ark. (2021), yaptığı bir çalışmada, metforminin PKOS hayvan modelinde DNA metilasyon paterni (5mC) ile H3K9 histon dimetilasyonu (H3K9-me2) ve ayrıca H4K16 ve H4K5 histon asetilasyonu (H4K16-ac ve H4K5-ac) gibi epigenetik düzenlemelerde meydana gelen değişiklikleri iyileştirmekle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Metformin tedavisinin aşırı androjenlerin neden olduğu olumsuz etkilerin önlenmesi ve PKOS hastalarında epigenetik değişikliklerin iyileştirilmesi açısından yararlı bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler göre *Trpv1* ve *Trpm2* genin de PKOS modelinde kontrole göre belirgin şekilde ekspresyonunun arttığını, buna karşın uygulanan metformin tedavisinde ekspresyon düzeylerinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığını ortaya koymuştur. Metformin tedavisi sonrasında over dokusunda metilasyon paternleri değerlendirildiğinde, *Trpv1* ekspresyonu ve promotör metilasyon durumları arasında beklenen negatif korelasyonun olmadığı gözlenmiştir. Fakat *Trpm2*'nin epigenetik düzenlenmesinde rol oynayabileceğini ve metilasyon seviyesindeki azalmanın gen ekspresyonundaki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Ovaryumdaki metilasyon, ovaryan fonksiyon üzerinde etkili olup anovulasyon, düzensiz menstruasyon ve infertilite gibi sorunlara yol açabilmektedir (D. Li ve ark., 2015). Literatürdeki çok sayıda çalışma, hipermetilasyonun hiperandrojenizm, androjen reseptörlerinin aşırı ekspresyonu ve diyabet ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Gravina ve

ark., 2011; Shiota ve ark., 2012). Çalışmalarda *DNMT* ekspresyonundaki artışın PKOS modellerinde oksidatif stresi artırdığı bildirilmiştir (Hitchler ve ark., 2006; Hurt ve ark., 2007). DNA metilasyon süreçlerini kontrol eden iki önemli gen olan *DNMT1* ve *DNMT3a* ekspresyonuna ilişkin sonuçlar, ovaryumda *DNMT1* ve *DNMT3a* ekspresyonunun PKOS grubunda anlamlı düzeyde arttığını, kersetin tedavisinin ise bu ekspresyonu belirgin şekilde azalttığını göstermiştir (Jafari-Khorchani ve ark., 2025). Çalışmamızda elde edilen bulgularla *Trpv1* ekspresyonundaki artışın ovulasyonu bozduğu; ancak over dokusunda da promotör bölge metilasyon profilleri ve gen ekspresyonlarının ilişkili olmadığı gözlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Bu çalışmada deneysel PKOS modelinde *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının ekspresyon ve metilasyon düzeylerindeki değişimler ile uygulanan tedavilerin bu parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, PKOS modelinde özellikle kan dokusunda *Trpv1* ve *Trpm2* ekspresyon düzeylerinde artış olduğunu ve bu durumun hastalığın inflamatuvar süreçleri ile oksidatif stres temelli patofizyolojisi ile uyumlu bir moleküler yanıt olabileceğini göstermektedir. Metformin tedavisinin metabolik stres ve oksidatif yükü azaltarak *Trpv1* ekspresyonunu baskıladığı ve bu kanalın ekspresyon düzeyinin kontrol grubunun altına kadar gerileyebildiği saptanmıştır. Metformin ile EE/DRSP kombinasyonu ise bu baskılayıcı etkiyi daha belirgin hale getirerek iyon kanallarının stres yanıtındaki aktivasyonunu daha güçlü biçimde azaltmıştır. Öte yandan EE/DRSP tedavisinin over dokusunda *Trpv1* gen ekspresyonunu artırırken *Trpm2* ekspresyonunu belirgin şekilde azaltması, hormonal tedavilerin *Trp* iyon kanallarının yer aldığı sinyal mekanizmaları üzerinden doku homeostazının yeniden düzenlenmesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Promotör bölge metilasyon paternlerinin gen ekspresyon düzeyleri ile tam paralellik göstermemesi, *Trpv1* ve *Trpm2* genlerinin düzenlenmesinde DNA metilasyonunun tek başına belirleyici olmadığını; oksidatif stres yanıtı, hormonal sinyal yolları ve diğer epigenetik düzenleyici mekanizmaların da önemli rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte tedavi gruplarında gözlenen metilasyon farklılıkları, epigenetik değişimlerin PKOS'ta tedaviye yanıtı yansıtan potansiyel biyolojik göstergeler olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, PKOS patogeneğinde *Trpv1* ve *Trpm2* iyon kanallarının hem ekspresyon hem de epigenetik düzenlenme düzeylerinde değişiklik gösterdiğini ve uygulanan tedavilerin bu moleküler mekanizmaları modüle ederek hastalığın patofizyolojisi üzerinde etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

6. 2. Öneriler

PKOS patogenezinde *Trp* iyon kanallarının rolünü daha ayrıntılı ortaya koyabilmek için *Trpv1* ve *Trpm2* kanalları protein düzeyinde ve fonksiyonel aktivite açısından da değerlendirilebilir. Bu kanalların PKOS ile ilişkili inflamasyon, oksidatif stres ve metabolik bozukluklar ile olan ilişkisini daha net ortaya koymak amacıyla daha geniş örneklem büyüklüğüne sahip deneysel ve klinik çalışmalar yapılabilir. Metformin ve hormonal tedavilerin *Trp* iyon kanalları üzerindeki etkilerini açıklayabilmek için hücresel sinyal yollarını inceleyen mekanistik çalışmaların gerçekleştirilmesi yararlı olacaktır. *Trpv1* ve *Trpm2* genlerinin epigenetik düzenlenmesinde rol oynayan diğer mekanizmaların (histone modifikasyonları, mikroRNA'lar ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi) araştırılması, PKOS patogenezinin moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. *Trp* iyon kanallarının PKOS'ta potansiyel biyobelirteç veya terapötik hedef olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla klinik örnekler üzerinde yapılacak translasyonel çalışmalar katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Amani Abkenari, S., Safdarian, L., Amidi, F., Hosseini, A., Aryanpour, R., et al. 2021. Metformin improves epigenetic modification involved in oocyte growth and embryo development in polycystic ovary syndrome mice model. *Molecular Reproduction and Development* 88(12): 817–829. <https://doi.org/10.1002/mrd.23537>
- Amiri, M., Kabir, A., Nahidi, F., Shekofteh, M., Ramezani Tehrani, F. 2018. Effects of combined oral contraceptives on the clinical and biochemical parameters of hyperandrogenism in patients with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 23(1): 64–77. <https://doi.org/10.1080/13625187.2018.1435779>
- Aranda, A., Pascual, A. 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81(3): 1269–1304. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269>
- Ataabadi, M. S., Bahmanpour, S., Yousefinejad, S., Alaei, S. 2023. Blood volatile organic compounds as potential biomarkers for poly cystic ovarian syndrome (PCOS): An animal study in the PCOS rat model. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 226(3): 106215. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106215>
- Attia, G. M., Almouteri, M. M., Alnakhli, F. T., Almouteri, M., Alnakhli, F. 2023. Role of metformin in polycystic ovary syndrome (PCOS)-related infertility. *Cureus* 15(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.44493>
- Azziz, R. 2021. How polycystic ovary syndrome came into its own. *F and S Science* 2(1): 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.xfss.2020.12.007>
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S. E., et al. 2016. Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 2(1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2016.57>
- Bahri Khomami, M., Joham, A. E., Boyle, J. A., Piltonen, T., Silagy, M., et al. 2019. Increased maternal pregnancy complications in polycystic ovary syndrome appear to be independent of obesity—A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Obesity Reviews* 20(5): 659–674. <https://doi.org/10.1111/OBR.12829>
- Berson, A., Nativio, R., Berger, S. L., Bonini, N. M. 2018. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences* 41(9): 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.05.005>
- Broekmans, F. J., Knauff, E. A. H., Valkenburg, O., Laven, J. S., Eijkemans, M. J., et al. 2006. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 113(10): 1210–1217. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.2006.01008.X>
- Bruni, V., Capozzi, A., Lello, S. 2021. The Role of genetics, epigenetics and lifestyle in polycystic ovary syndrome development: The State of the Art. *Reproductive Sciences* 29(3): 668–679. <https://doi.org/10.1007/S43032-021-00515-4>
- Carmina, E., Azziz, R., Bergfeld, W., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., et al. 2019. Female pattern hair loss and androgen excess: a report from the multidisciplinary androgen excess and PCOS committee. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 104(7): 2875–2891. <https://doi.org/10.1210/JC.2018-02548>
- Cena, H., Chiovato, L., Nappi, R. E. 2020. Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 105(8): e2695–e2709. <https://doi.org/10.1210/CLINEM/DGAA285>
- Chen, S. J., Bao, L., Keefer, K., Shanmughapriya, S., Chen, L., et al. 2020. Transient receptor potential ion channel TRPM2 promotes AML proliferation and survival through modulation of mitochondrial function, ROS, and autophagy. *Cell Death & Disease* 11(4): 247. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2454-8>
- Chen, Y., Xie, M., Wu, S., Deng, Z., Tang, Y., et al. 2024. Multi-omics approach to reveal follicular metabolic changes and their effects on oocyte competence in PCOS patients. *Frontiers in Endocrinology* 15: 1426517. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2024.1426517>
- Condorelli, R. A., Calogero, A. E., Di Mauro, M., La Vignera, S. 2017. PCOS and diabetes mellitus: from insulin resistance to altered beta pancreatic function, a link in evolution. *Gynecological Endocrinology* 33(9): 665–667. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1342240>
- Coyle, C., Campbell, R. E. 2019. Pathological pulses in PCOS. *Molecular and Cellular Endocrinology* 498: 110561. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2019.110561>

- Cui, P., Ma, T., Tamadon, A., Han, S., Li, B., et al. 2018. Hypothalamic DNA methylation in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome: effects of low-frequency electro-acupuncture. *Experimental Physiology* 103(12): 1618–1632. <https://doi.org/10.1113/EP087163>
- Della Corte, L., Foreste, V., Barra, F., Gustavino, C., Alessandri, F., et al. 2020. Current and experimental drug therapy for the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29(8): 819–830. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1781815>
- Deswal, R., Narwal, V., Dang, A., Pundir, C. S. 2020. The prevalence of polycystic ovary syndrome: A brief systematic review. *Journal of Human Reproductive Sciences* 13(4): 261–271. https://doi.org/10.4103/JHRS.JHRS_95_18
- Ding, H., Zhang, J., Zhang, F., Zhang, S., Chen, X., et al. 2021. Resistance to insulin and elevated level of androgen: A major cause of polycystic ovary syndrome. *Frontiers in Endocrinology* 12: 741764. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.741764>
- Du, Y., Zhu, Y. J., Zhou, Y. X., Ding, J., Liu, J. Y. 2022. Metformin in therapeutic applications in human diseases: its mechanism of action and clinical study. *Molecular Biomedicine* 3(1): 1–32. <https://doi.org/10.1186/S43556-022-00108-W>
- Dutta, S., Sengupta, P., Mottola, F., Das, S., Hussain, A., et al. 2024. Crosstalk between oxidative stress and epigenetics: Unveiling New Biomarkers in Human Infertility. *Cells* 13(22): 1846. <https://doi.org/10.3390/CELLS13221846>
- Elokely, K., Velisetty, P., Delemotte, L., Palovcak, E., Klein, M. L., et al. 2016. Understanding TRPV1 activation by ligands: insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 113(2): E137–E145. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517288113>
- Eubler, K., Caban, K. M., Dissen, G. A., Berg, U., Berg, D., et al. 2023. TRPV2, a novel player in the human ovary and human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction* 29(9). <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAAD029>
- Eubler, K., Herrmann, C., Tiefenbacher, A., Köhn, F. M., Schwarzer, J. U., et al. 2018. Ca²⁺ signaling and IL-8 secretion in human testicular peritubular cells involve the cation channel TRPV2. *International Journal of Molecular Sciences* 19(9): 2829. <https://doi.org/10.3390/IJMS19092829>
- Eubler, K., Rantakari, P., Gerke, H., Herrmann, C., Missel, A., et al. 2021. Exploring the ion channel TRPV2 and testicular macrophages in mouse testis. *International Journal of Molecular Sciences* 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22094727>
- Fallah, H. P., Ahuja, E., Lin, H., Qi, J., He, Q., et al. 2022. A review on the role of TRP channels and their potential as drug targets: An insight into the TRP channel drug discovery methodologies. *Frontiers in Pharmacology* 13: 914499. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.914499>
- Forslund, M., Melin, J., Alesi, S., Piltonen, T., Romualdi, D., et al. 2023. Combined oral contraceptive pill compared with no medical treatment in the management of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Clinical Endocrinology* 99(1): 79–91. <https://doi.org/10.1111/CEN.14913>
- Franks, S., Stark, J., Hardy, K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update* 14(4): 367–378. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMN015>
- Fu, X., Pan, Y., Cao, Q., Li, B., Wang, S., et al. 2018. Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. *BMC Cardiovascular Disorders* 18(1): 63. <https://doi.org/10.1186/S12872-018-0805-5>
- Fu, Y., Xie, P., Yang, Q., Chen, P., Yu, J. 2024. Analysis on the therapeutic effect of Cangfu Daotan Decoction combined with drospirenone and ethinylestradiol tablets (II) on patients with polycystic ovary syndrome. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 170: 106801. <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2023.106801>
- García-Giménez, J. L., Garcés, C., Romá-Mateo, C., Pallardó, F. V. 2021. Oxidative stress-mediated alterations in histone post-translational modifications. *Free Radical Biology and Medicine* 170: 6–18. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.02.027>
- García-Gómez, E., Gómez-Viais, Y. I., Cruz-Aranda, M. M., Martínez-Razo, L. D., Reyes-Mayoral, C., et al. 2023. The effect of metformin and carbohydrate-controlled diet on DNA methylation and gene expression in the endometrium of women with polycystic ovary syndrome. *International Journal of Molecular Sciences* 24(7): 6857. <https://doi.org/10.3390/ijms24076857>

- Geisthövel, F. 2003. A comment on the European Society of human reproduction and Embryology/American society for reproductive medicine consensus of the polycystic ovarian syndrome. *Reproductive BioMedicine Online* 7(6): 602–605. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62081-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62081-0)
- Ghodke-Puranik, Y., Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., et al. 2013. Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics* 23(4): 236–241. <https://doi.org/10.1097/FPC.0B013E32835EA0B2>
- Gravina, G. L., Marampon, F., Piccolella, M., Motta, M., Ventura, L., et al. 2011. Hormonal therapy promotes hormone-resistant phenotype by increasing DNMT activity and expression in prostate cancer models. *Endocrinology* 152(12): 4550–4561. <https://doi.org/10.1210/EN.2011-1056>
- Gu, L., Wang, Q., Sun, Q. Y. 2010. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle* 9(10): 1942–1950. <https://doi.org/10.4161/CC.9.10.11599>
- Guan, Y., Wang, D., Bu, H., Zhao, T., Wang, H. 2020. The effect of metformin on polycystic ovary syndrome in overweight women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Endocrinology* 2020(1): 5150684. <https://doi.org/10.1155/2020/5150684>
- Hacimuftuoglu, A., Mohammadzadeh, M., Taghizadehghalehjoughi, A., Taspinar, N., Togar, B., et al. 2020. The analgesic effect of metformin on paclitaxel-induced neuropathic pain model in rats: by considering pathological results. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 16(1): 34–39. https://doi.org/10.4103/jert.JCRT_1455_16
- Hagberg, C. E., Spalding, K. L. 2023. White adipocyte dysfunction and obesity-associated pathologies in humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 25(4): 270–289. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00680-1>
- Hajam, Y. A., Rather, H. A., Neelam, Kumar, R., Basheer, M., et al. 2024. A review on critical appraisal and pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *Endocrine and Metabolic Science* 14: 100162. <https://doi.org/10.1016/J.ENDMTS.2024.100162>
- Hardie, D. G. 2008. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International Journal of Obesity* 32(4): S7–S12. <https://doi.org/10.1038/IJO.2008.116>
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E., Brunet, A. 2016. AMPK: An energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends in Cell Biology* 26(3): 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.013>
- Hasanvand, A. 2022. The role of AMPK-dependent pathways in cellular and molecular mechanisms of metformin: a new perspective for treatment and prevention of diseases. *Inflammopharmacology* 30(3): 775–788. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-00980-6>
- Heidari, B., Lerman, A., Lalia, A. Z., Lerman, L. O., Chang, A. Y. 2019. Effect of metformin on microvascular endothelial function in polycystic ovary syndrome. *Mayo Clinic Proceedings* 94(12): 2455–2466. <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2019.06.015>
- Hiroi, H., Momoeda, M., Watanabe, T., Ito, M., Ikeda, K., et al. 2013. Expression and regulation of transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) in human endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 365(2): 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.015>
- Hitchler, M. J., Wikainapakul, K., Yu, L., Powers, K., Attatippaholkun, W., et al. 2006. Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. *Epigenetics* 1(4): 163–171. <https://doi.org/10.4161/EPI.1.4.3401>
- Huang, A., Brennan, K., Azziz, R. 2010. Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertility and Sterility* 93(6): 1938–1941. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2008.12.138>
- Huang, C. C., Yang, P. K., Huang, Y. S., Chen, S. U., Yang, Y. S., et al. 2023. The role of circulating miRNAs in mechanism of action and prediction of therapeutic responses of metformin in polycystic ovarian syndrome. *Fertility and Sterility* 119(5): 858–868. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2022.12.045>
- Huang, T., Chen, X., Chen, D., Yu, B., He, J., et al. 2023. Eugenol promotes appetite through TRP channels mediated-CaMKK2/AMPK signaling pathway. *Phytotherapy Research* 37(7): 2759–2770. <https://doi.org/10.1002/PTR.7768>
- Hurt, E. M., Thomas, S. B., Peng, B., Farrar, W. L. 2007. Molecular consequences of SOD2 expression in epigenetically silenced pancreatic carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer* 97(8): 1116–1123. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604000>

- Illingworth, R., Kerr, A., DeSousa, D., Jørgensen, H., Ellis, P., et al. 2008. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLOS Biology* 6(1): e22. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060022>
- Jafari-Khorchani, M., Neisy, A., Alaei, S., Zare-Mehrjardi, M. J., Zal, F. 2025. Quercetin modulates the interplay between DNMT gene expression, oxidative stress, and trace elements in DHEA-induced polycystic ovary syndrome rat model. *Scientific Reports* 15(1): 34770. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18635-1>
- Joham, A. E., Teede, H. J., Ranasinha, S., Zoungas, S., Boyle, J. 2015. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: Data from a large community-based cohort study. *Journal of Women's Health* 24(4): 299–307. <https://doi.org/10.1089/JWH.2014.5000>
- Kamada, S., Yamamoto, Y., Aoki, H., Tamura, K., Takeda, A., et al. 2022. A novel PCOS rat model and an evaluation of its reproductive, metabolic, and behavioral phenotypes. *Reproductive Medicine and Biology* 21(1): e12416. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12416>
- Karjula, S., Morin-Papunen, L., Auvinen, J., Ruokonen, A., Puukka, K., et al. 2017. Psychological distress is more prevalent in fertile age and premenopausal women with PCOS symptoms: 15-year follow-up. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102(6): 1861–1869. <https://doi.org/10.1210/JC.2016-3863>
- Kato, S., Shiozaki, A., Kudou, M., Shimizu, H., Kosuga, T., et al. 2021. TRPV2 promotes cell migration and invasion in gastric cancer via the transforming growth factor- β signaling pathway. *Annals of Surgical Oncology* 29(5): 2944–2956. <https://doi.org/10.1245/S10434-021-11132-5>
- Kaya, M. G., Calapkorur, B., Karaca, Z., Yildirim, S., Celik, A., et al. 2012. The effects of treatment with drospirenone/ethinyl oestradiol alone or in combination with metformin on elastic properties of aorta in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology* 77(6): 885–892. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2265.2012.04436.X>
- Kelley, S. T., Skarra, D. V., Rivera, A. J., Thackray, V. G. 2016. The gut microbiome is altered in a letrozole-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *PLOS ONE* 11(1): e0146509. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0146509>
- Khosrowpour, Z., Fahimi, S., Jafari, F., Tansaz, M., Sahranavard, S., et al. 2022. Beneficial effects of *Teucrium polium* hydroalcoholic extract on letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rat model. *Obstetrics & Gynecology Science* 66(2): 107–117. <https://doi.org/10.5468/OGS.22129>
- Klungland, A., Robertson, A. B. 2017. Oxidized C5-methyl cytosine bases in DNA: 5-hydroxymethylcytosine; 5-formylcytosine; and 5-carboxycytosine. *Free Radical Biology and Medicine* 107: 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.11.038>
- Kokosar, M., Benrick, A., Perfilyev, A., Fornes, R., Nilsson, E., et al. 2016. Epigenetic and transcriptional alterations in human adipose tissue of polycystic ovary syndrome. *Scientific Reports* 6(1): 22883. <https://doi.org/10.1038/srep22883>
- Kokosar, M., Benrick, A., Perfilyev, A., Nilsson, E., Källman, T., et al. 2018. A single bout of electroacupuncture remodels epigenetic and transcriptional changes in adipose tissue in polycystic ovary syndrome. *Scientific Reports* 8(1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17919-5>
- Köse, S. A., Nazıroğlu, M. 2014. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biological Trace Element Research* 158(2): 136–142. <https://doi.org/10.1007/S12011-014-9929-3>
- Köse, S. A., Nazıroğlu, M. 2015. N-acetyl cysteine reduces oxidative toxicity, apoptosis, and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Free Radical Research* 49(3): 338–346. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1006214>
- Krattenmacher, R. 2000. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception* 62(1): 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(00\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(00)00133-5)
- Li, D., Jiao, J., Zhou, Y. M., Wang, X. X. 2015. Epigenetic regulation of TRAF2- and Nck-interacting kinase (TNIK) in polycystic ovary syndrome. *American Journal of Translational Research* 7(6): 1152.
- Li, L., Zhang, R., Zeng, J., Ke, H., Peng, X., et al. 2020a. Effectiveness and safety assessment of drospirenone/ethinyl estradiol tablet in treatment of PCOS patients: A single center, prospective, observational study. *BMC Women's Health* 20(1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12905-020-00905-X>

- Li, Y., Chen, C., Ma, Y., Xiao, J., Luo, G., et al. 2019. Multi-system reproductive metabolic disorder: significance for the pathogenesis and therapy of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Life Sciences* 228: 167–175. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.04.046>
- Li, Y., Zheng, Q., Sun, D., Cui, X., Chen, S., et al. 2019. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *Journal of Cellular Physiology* 234(5): 7435–7447. <https://doi.org/10.1002/JCP.27501>
- Lin, S. C., Hardie, D. G. 2018. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status. *Cell Metabolism* 27(2): 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009>
- Liu, Y. D., Li, Y., Feng, S. X., Ye, D. S., Chen, X., et al. 2017. Long noncoding RNAs: potential regulators involved in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 158(11): 3890–3899. <https://doi.org/10.1210/EN.2017-00605>
- Liu, Y. N., Qin, Y., Wu, B., Peng, H., Li, M., et al. 2022. DNA methylation in polycystic ovary syndrome: emerging evidence and challenges. *Reproductive Toxicology* 111: 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2022.04.010>
- Lohrasbi, P., Karbalay-Doust, S., Tabei, S. M. B., Azarpira, N., Alaei, S., et al. 2022. The effects of melatonin and metformin on histological characteristics of the ovary and uterus in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome mice: A stereological study. *International Journal of Reproductive Biomedicine* 20(11): 973–988. <https://doi.org/10.18502/IJRM.V20I11.12365>
- Lu, K. T., Ho, Y. C., Chang, C. L., Lan, K. C., Wu, C. C., Su, Y. T. 2022. Evaluation of bodily pain associated with polycystic ovary syndrome: a review of health-related quality of life and potential risk factors. *Biomedicines* 10(12): 3197. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123197>
- Luo, L., Manda, S., Park, Y., Demir, B., Sanchez, J., et al. 2023. DNA nanopores as artificial membrane channels for bioprotonics. *Nature Communications* 14(1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/S41467-023-40870-1>
- Knowlton, W. M., McKemy, D. D. 2011. TRPM8: from cold to cancer, peppermint to pain. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12(1): 68–77.
- Magzoub, R., Kheirleisid, E. A. H., Perks, C., Lewis, S. 2022. Does metformin improve reproduction outcomes for non-obese, infertile women with polycystic ovary syndrome? Meta-analysis and systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 271: 38–62. <https://doi.org/10.1016/J.EJOGRB.2022.01.025>
- Mahmoud, A. A., Elfiky, A. M., Abo-Zeid, F. S. 2022. The anti-androgenic effect of quercetin on hyperandrogenism and ovarian dysfunction induced in a dehydroepiandrosterone rat model of polycystic ovary syndrome. *Steroids* 177: 108936. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108936>
- Mannerås, L., Cajander, S., Holmäng, A., Seleskovic, Z., Lystig, T., et al. 2007. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 148(8): 3781–3791. <https://doi.org/10.1210/EN.2007-0168>
- March, W. A., Moore, V. M., Willson, K. J., Phillips, D. I. W., Norman, R. J., et al. 2010. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction* 25(2): 544–551. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEP399>
- Martín-Núñez, G. M., Rubio-Martín, E., Cabrera-Mulero, R., Rojo-Martínez, G., Oliveira, G., et al. 2014. Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: A cohort study. *Epigenetics* 9(10): 1322–1328. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.969617>
- McDonnell, R., Hart, R. J. 2017. Pregnancy-related outcomes for women with polycystic ovary syndrome. *Women's Health* 13(3): 89–97. <https://doi.org/10.1177/1745505717731971>
- Mehrpour, O., Saeedi, F., Hoyte, C., Hadianfar, A., Nakhaee, S., et al. 2022. Distinguishing characteristics of exposure to biguanide and sulfonylurea anti-diabetic medications in the United States. *The American Journal of Emergency Medicine* 56: 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.AJEM.2022.03.023>
- Min, M., Ruan, X., Mueck, A. O. 2022. Advanced therapy of overweight or obese polycystic ovary syndrome: a prospective study. *Global Health Journal* 6(2): 75–79. <https://doi.org/10.1016/J.GLOHJ.2022.04.004>
- Mirseyyed, S. F., Zavareh, S., Nasiri, M., Hashemi-Moghaddam, H. 2023. An experimental study on the oxidative status and inflammatory levels of a rat model of polycystic ovary syndrome induced by letrozole and a new high-fat diet. *International Journal of Fertility & Sterility* 18(1): 45. <https://doi.org/10.22074/IJFS.2023.1972296.1391>

- Mohammed, S., Sundaram, V., Cockburn, B. N., Motilal, S., Ottey, S., et al. 2025. The association of polycystic ovary syndrome-like clinical features and socioeconomic status on health-related quality of life. *Women's Health Reports* 6(1): 493–503. <https://doi.org/10.1089/whr.2025.0008>
- Monet, M., Lehen'kyi, V., Gackiere, F., Firlej, V., Vandenberghe, M., et al. 2010. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Research* 70(3): 1225–1235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2205>
- Moore, A. M., Campbell, R. E. 2017. Polycystic ovary syndrome: understanding the role of the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology* 46: 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2017.05.002>
- Moradi, N., Bidgoli, S. A., Chaichian, S. 2021. Ovarian cysts disappear after 14-day oral regimen of Korean red ginseng extract in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome. *Obstetrics & Gynecology Science* 64(3): 274–283. <https://doi.org/10.5468/OGS.20094>
- Mousa, A., Tay, C. T., Teede, H. 2023. Technical report for the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome.
- Mvondo, M. A., Mzemdem Tsoplack, F. I., Awounfack, C. F., Njamen, D. 2020. The leaf aqueous extract of *Myrianthus arboreus* P. Beauv. (Cecropiaceae) improved letrozole-induced polycystic ovarian syndrome associated conditions and infertility in female Wistar rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 20(1): 275. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03070-8>
- Nagasawa, M., Nakagawa, Y., Tanaka, S., Kojima, I. 2007. Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *Journal of Cellular Physiology* 210(3): 692–702. <https://doi.org/10.1002/JCP.20883>
- Ndeingang, E. C., Defo Deeh, P. B., Watcho, P., Kamanyi, A. 2019. *Phyllanthus muellerianus* (Euphorbiaceae) restores ovarian functions in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019: 2965821. <https://doi.org/10.1155/2019/2965821>
- Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C., Altucci, L. 2018. Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS Genetics* 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J. A. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews* 87(1): 165–217. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00021.2006>
- Nozu, T., Miyagishi, S., Kumei, S., Nozu, R., Takakusaki, K., et al. 2019. Metformin inhibits visceral allodynia and increased gut permeability induced by stress in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 34(1): 186–193. <https://doi.org/10.1111/jgh.14367>
- Olaniyi, K. S., Bashir, A. A. M., Areloegbe, S. E., Sabinari, I. W., Akintayo, C. O., et al. 2022. Short chain fatty acid, acetate restores ovarian function in experimentally induced PCOS rat model. *PLOS ONE* 17(7): e0272124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272124>
- Oliveira, D. V. N. P., Hentze, J., O'Rourke, C. J., Andersen, J. B., Høgdall, C., et al. 2021. DNA methylation in ovarian tumors—a comparison between fresh tissue and FFPE samples. *Reproductive Sciences* 28(11): 3212–3218. <https://doi.org/10.1007/S43032-021-00589-0>
- Osuka, S., Nakanishi, N., Murase, T., Nakamura, T., Goto, M., et al. 2019. Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. *Reproductive Medicine and Biology* 18(2): 151–160. <https://doi.org/10.1002/RMB2.12262>
- Pan, J. X., Tan, Y. J., Wang, F. F., Hou, N. N., Xiang, Y. Q., et al. 2018. Aberrant expression and DNA methylation of lipid metabolism genes in PCOS: a new insight into its pathogenesis. *Clinical Epigenetics* 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13148-018-0442-Y>
- Park, C. H., Chun, S. 2019. Influence of combined oral contraceptives on polycystic ovarian morphology-related parameters in Korean women with polycystic ovary syndrome. *Obstetrics & Gynecology Science* 63(1): 80. <https://doi.org/10.5468/OGS.2020.63.1.80>
- Patel, S. 2018. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 182: 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2018.04.008>
- Paton, D. M. 2020. Drospirenone: A novel progestogen used as an oral contraceptive without an estrogen component. *Drugs of Today* 56(5): 321–328. <https://doi.org/10.1358/DOT.2020.56.5.3134788>

- Pohoczky, K., Kun, J., Szalontai, B., Saghy, E., Payrits, M. 2016. Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium.
- Polak, A. M., Adamska, A., Krentowska, A., Lebkowska, A., Hryniewicka, J., et al. 2020. Body composition, serum concentrations of androgens and insulin resistance in different polycystic ovary syndrome phenotypes. *Journal of Clinical Medicine* 9(3): 732. <https://doi.org/10.3390/JCM9030732>
- Pundir, J., Charles, D., Sabatini, L., Hiam, D., Jitpiriyaraj, S., et al. 2019. Overview of systematic reviews of non-pharmacological interventions in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update* 25(2): 243–256. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMY045>
- Qadri, S., Hussain, A., Bhat, M. H., Baba, A. A. 2018. Polycystic ovary syndrome in bipolar affective disorder: a hospital-based study. *Indian Journal of Psychological Medicine* 40(2): 121–128. https://doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM_284_17
- Qian, H. Y., Zhou, F., Wu, R., Cao, X. J., Zhu, T., et al. 2021. Metformin attenuates bone cancer pain by reducing TRPV1 and ASIC3 expression. *Frontiers in Pharmacology* 12: 713944. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.713944>
- Rabah, H. M., Mohamed, D. A., Mariah, R. A., Abd El-Khalik, S. R., Khattab, H. A., et al. 2023. Novel insights into the synergistic effects of selenium nanoparticles and metformin treatment of letrozole-induced polycystic ovarian syndrome: targeting PI3K/Akt signalling pathway, redox status and mitochondrial dysfunction in ovarian tissue. *Redox Report* 28(1). <https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2160569>
- Rajan, R. K., Kumar, M. S. S., Balaji, B. 2017. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharmaceutical Biology* 55(1): 242–251. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1258425>
- Ramezani Tehrani, F., Behboudi-Gandevani, S., Bidhendi Yarandi, R., Saei Ghare Naz, M., Carmina, E. 2021. Prevalence of acne vulgaris among women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Gynecological Endocrinology* 37(5): 392–405. <https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1859474>
- Raofi, A., Rezaie, M. J., Delbari, A., Ghoreishi, S. A. H., Sichani, P. H., et al. 2022. Therapeutic potentials of caffeine in polycystic ovary syndrome in a rat model: via modulation of proinflammatory cytokines and antioxidant activity. *Allergologia et Immunopathologia* 50(6): 137–146. <https://doi.org/10.15586/aei.v50i6.715>
- Rashid, R., Tripathi, R., Singh, A., Sarkar, S., Kawale, A., et al. 2023. Naringenin improves ovarian health by reducing the serum androgen and eliminating follicular cysts in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in Sprague Dawley rats. *Phytotherapy Research* 37(9): 4018–4041. <https://doi.org/10.1002/PTR.7860>
- Roberts, R. E., Farahani, L., Webber, L., Jayasena, C. 2020. Current understanding of hypothalamic amenorrhoea. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 11. <https://doi.org/10.1177/2042018820945854>
- Rosa-Garrido, M., Chapski, D. J., Vondriska, T. M. 2018. Epigenomes in cardiovascular disease. *Circulation Research* 122(11): 1586–1607. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311597>
- Rosenberger, D. C., Binzen, U., Treede, R. D., Greffrath, W. 2020. The capsaicin receptor TRPV1 is the first line defense protecting from acute non-damaging heat: a translational approach. *Journal of Translational Medicine* 18(1): 28. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02200-2>
- Ruan, X., Kubba, A., Aguilar, A., Mueck, A. O., Kubba, A., et al. 2017. Use of cyproterone acetate/ethinylestradiol in polycystic ovary syndrome: rationale and practical aspects. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 22(3): 183–190. <https://doi.org/10.1080/13625187.2017.1317735>
- Ruddenklau, A., Campbell, R. E. 2019. Neuroendocrine impairments of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 160(10): 2230–2242. <https://doi.org/10.1210/EN.2019-00428>
- Russe, O. Q., Möser, C. V., Kynast, K. L., King, T. S., Stephan, H., et al. 2013. Activation of the AMP-activated protein kinase reduces inflammatory nociception. *The Journal of Pain* 14(11): 1330–1340. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.05.012>
- Ryu, Y., Kim, S. W., Kim, Y. Y., Ku, S. Y. 2019. Animal models for human polycystic ovary syndrome (PCOS) focused on the use of indirect hormonal perturbations: a review of the literature. *International Journal of Molecular Sciences* 20(11): 2720. <https://doi.org/10.3390/IJMS20112720>

- Santos, S. A. A. R., Damasceno, M. de B. M. V., Sessle, B. J., Vieira-Neto, A. E., de Oliveira Leite, G., et al. 2024. Sex differences in the orofacial antinociceptive effect of metformin and the role of transient receptor potential channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 398(4): 3775–3788. <https://doi.org/10.1007/S00210-024-03475-Z>
- Seem, K., Kaur, S., Kumar, S., Mohapatra, T. 2024. Epigenome editing for targeted DNA (de)methylation: a new perspective in modulating gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 59(1–2): 69–98. <https://doi.org/10.1080/10409238.2024.2320659>
- Sendur, S. N., Yildiz, B. O. 2021. Influence of ethnicity on different aspects of polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Reproductive BioMedicine Online* 42(4): 799–818. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2020.12.006>
- Senner, C. E. 2011. The role of DNA methylation in mammalian development. *Reproductive BioMedicine Online* 22(6): 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.02.016>
- Shen, H. R., Qiu, L. H., Zhang, Z. Q., Qin, Y. Y., Cao, C., et al. 2013. Genome-wide methylated DNA immunoprecipitation analysis of patients with polycystic ovary syndrome. *PLOS ONE* 8(5): e64801. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0064801>
- Shiota, M., Takeuchi, A., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Tatsugami, K., et al. 2012. Methyltransferase inhibitor adenosine dialdehyde suppresses androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Journal of Urology* 188(1): 300–306. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2012.02.2553>
- Shpakov, A. O., Sechenov, I. M. 2021. Improvement effect of metformin on female and male reproduction in endocrine pathologies and its mechanisms. *Pharmaceuticals* 14(1): 42. <https://doi.org/10.3390/PH14010042>
- Shuba, Y. M. 2021. Beyond neuronal heat sensing: diversity of TRPV1 heat-capsaicin receptor-channel functions. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14: 612480. <https://doi.org/10.3389>
- Siveen, K. S., Nizamuddin, P. B., Uddin, S., Al-Thani, M., Frenneaux, M. P., et al. 2020. TRPV2: a cancer biomarker and potential therapeutic target. *Disease Markers* 2020: 8892312. <https://doi.org/10.1155/2020/8892312>
- Sondermann, J. R., Barry, A. M., Jahn, O., Michel, N., Abdelaziz, R., et al. 2019. Vt1b promotes TRPV1 sensitization during inflammatory pain. *Pain* 160(2): 508–527. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001418>
- Stein, I. F., Leventhal, M. L. 1935. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 29(2): 181–191. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(15\)30642-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(15)30642-6)
- Stener-Victorin, E., Teede, H., Norman, R. J., Legro, R., Goodarzi, M. O., et al. 2024. Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 10(1): 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00511-3>
- Sun, J., Jin, C., Wu, H., Zhao, J., Cui, Y., et al. 2013. Effects of electro-acupuncture on ovarian P450arom, P450c17 α and mRNA expression induced by letrozole in PCOS rats. *PLOS ONE* 8(11): e79382. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0079382>
- Szeliga, A., Rudnicka, E., Maciejewska-Jeske, M., Kucharski, M., Kostrzak, A., et al. 2022. Neuroendocrine determinants of polycystic ovary syndrome. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(5): 3089. <https://doi.org/10.3390/IJERPH19053089>
- Szymczak-Pajor, I., Wenclewska, S., Śliwińska, A. 2022. Metabolic action of metformin. *Pharmaceuticals* 15(7): 810. <https://doi.org/10.3390/PH15070810>
- Teede, H. J., Tay, C. T., Laven, J., Dokras, A., Moran, L. J., et al. 2023. Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 120(4): 767–793. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.07.025>
- The Human Protein Atlas 2025. Retrieved November 19, 2025, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187688-TRPV2/single+cell>
- Turkcapar, A. F., Seckin, B., Onalan, G., Ozdener, T., Batioglu, S. 2013. Human menopausal gonadotropin versus recombinant FSH in polycystic ovary syndrome patients undergoing in vitro fertilization. *International Journal of Fertility & Sterility* 6(4): 238.
- Uchida, Y., Izumizaki, M. 2021. Effect of menstrual cycle and female hormones on TRP and TREK channels in modifying thermosensitivity and physiological functions in women. *Journal of Thermal Biology* 100: 103029. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2021.103029>

- Vanselow, J., Fürbass, R., Vanselow, J., Fürbass, R. 2018. Epigenetic control of folliculogenesis and luteinization. *Animal Reproduction* 7(3): 134.
- Viswanathan, L. G., Satishchandra, P., Bhimani, B. C., Reddy, J. Y. C., Murthy, B. S. R., et al. 2016. Polycystic ovary syndrome in patients on antiepileptic drugs. *Annals of Indian Academy of Neurology* 19(3): 339–343. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.179973>
- Wang, J., Wu, D., Guo, H., Li, M. 2019. Hyperandrogenemia and insulin resistance: the chief culprit of polycystic ovary syndrome. *Life Sciences* 236: 116940. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.116940>
- Wang, M. X., Yin, Q., Xu, X. 2020. A rat model of polycystic ovary syndrome with insulin resistance induced by letrozole combined with high fat diet. *Medical Science Monitor* 26: e922136. <https://doi.org/10.12659/MSM.922136>
- Wang, Y. Y., Lee, K. T., Lim, M. C., Choi, J. H. 2020. TRPV1 antagonist DWP05195 induces ER stress-dependent apoptosis through the ROS-p38-CHOP pathway in human ovarian cancer cells. *Cancers* 12(6): 1702. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12061702>
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., Maier, S. F. 2003. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 521: 1–21
- Wu, Y., Li, P., Zhang, D., Sun, Y. 2018. Metformin and pioglitazone combination therapy ameliorate polycystic ovary syndrome through AMPK/PI3K/JNK pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* 15(2): 2120–2127. <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.5650>
- Wu, Y., Wang, Y., Wang, J., Fan, Q., Zhu, J., et al. 2019. TLR4 mediates upregulation and sensitization of TRPV1 in primary afferent neurons in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis. *Molecular Pain* 15: 1744806919830018. <https://doi.org/10.1177/1744806919830018>
- Xu, B., Dai, W., Liu, L., Han, H., Zhang, J., et al. 2022. Metformin ameliorates polycystic ovary syndrome in a rat model by decreasing excessive autophagy in ovarian granulosa cells via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Endocrine Journal* 69(7): 863–875. <https://doi.org/10.1507/ENDOCRJ.EJ21-0480>
- Xu, N., Azziz, R., Goodarzi, M. O. 2010. Epigenetics in polycystic ovary syndrome: a pilot study of global DNA methylation. *Fertility and Sterility* 94(2): 781–783.e1. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.10.020>
- Xu, N., Chua, A. K., Jiang, H., Liu, N. A., Goodarzi, M. O. 2014. Early embryonic androgen exposure induces transgenerational epigenetic and metabolic changes. *Molecular Endocrinology* 28(8): 1329–1336. <https://doi.org/10.1210/ME.2014-1042>
- Yamashiro, K., Sasano, T., Tojo, K., Namekata, I., Kurokawa, J., et al. 2010. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398(2): 284–289. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.06.082>
- Yang, H., Lee, S. Y., Lee, S. R., Pyun, B. J., Kim, H. J., et al. 2018. Therapeutic effect of *Ecklonia cava* extract in letrozole-induced polycystic ovary syndrome rats. *Frontiers in Pharmacology* 9: 1325. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01325>
- Yang, W., Wang, L., Wang, F., Yuan, S. 2020. Roles of AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian reproduction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 593005. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.593005>
- Yildiz, B. O., Bozdag, G., Yapici, Z., Esinler, I., Yarali, H. 2012. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Human Reproduction* 27(10): 3067–3073. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DES232>
- Yu, Y. Y., Sun, C. X., Liu, Y. K., Li, Y., Wang, L., et al. 2015. Genome-wide screen of ovary-specific DNA methylation in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 104(1): 145–153.e6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.005>
- Zhang, D., Cong, J., Shen, H., Wu, Q., Wu, X. 2014. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoters in ovarian tissue of prenatally androgenized rats. *Fertility and Sterility* 102(5): 1458–1467. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2014.07.1203>
- Zhang, L., Li, H., Li, S., Zou, X. 2016. Reproductive and metabolic abnormalities in women taking valproate for bipolar disorder: a meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 202: 26–31. <https://doi.org/10.1016/J.EJOGRB.2016.04.038>

- Zhang, W., Peng, C., Xu, L., Zhao, Y., Huang, C., et al. 2024. The therapeutic effects of curcumin on polycystic ovary syndrome by upregulating PPAR- γ expression and reducing oxidative stress in a rat model. *Frontiers in Endocrinology* 15: 1494852. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1494852>
- Zhang, Y., Yan, Z., Qin, Q., Nisenblat, V., Chang, H. M., et al. 2018. Transcriptome landscape of human folliculogenesis reveals oocyte and granulosa cell interactions. *Molecular Cell* 72(6): 1021–1034.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.029>
- Zhao, H., Zhang, J., Cheng, X., Nie, X., He, B. 2023. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome across various tissues: an updated review of pathogenesis, evaluation, and treatment. *Journal of Ovarian Research* 16(1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13048-022-01091-0>
- Zholos, A. 2010. Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature. *British Journal of Pharmacology* 159(8): 1559–1571. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00649>
- Zhong, X., Jin, F., Huang, C., Du, M., Gao, M., et al. 2021. DNA methylation of AMHR2 and INSR gene is associated with the pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Technology and Health Care* 29(S1): S11–S25. <https://doi.org/10.3233/THC-218002>
- Zhou, F., Qian, H. Y., Wang, K., Gu, Y. J., Liu, P. L., et al. 2024. Metformin relieves bone cancer pain by reducing TGF β RI-TRPV1 signaling in rats. *Heliyon* 10(15): e34991. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34991>
- Zhu, S., Li, Z., Hu, C., Sun, F., Wang, C., et al. 2021. Imaging-based body fat distribution in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology* 12: 697223. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.697223>

8. EKLER

8.1. EK 1 Etik kurul kararı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



KURUL KARARI

KARAR NO: 2023/46	Proje KABUL NO: 2023-46	KARAR TARİHİ: 22.06.2023
"RAT POLİKİSTİK OVER SENDROMU MODELİNDE TRPV1 VE TRPM2 İYON KANALLARININ EKSPRESYONUNUN VE METİLYASYONUN ROLÜ" THE ROLE OF EXPRESSION AND METHYLATION OF TRPV1 AND TRPM2 ION CHANNELS IN RAT POLYCYSTIC OVARY SYNDROME MODEL.		
YÜRÜTÜCÜ Prof. Dr. Bahattin AVCI		
E-POSTA		
KURUM Tıp Fakültesi		
<ul style="list-style-type: none">Yukarıda tanımlanan Laboratuvar Hayvanları ile yapılan çalışmayı; belirtilen araştırmacılar ile gerçekleştireceğini, ekip dışında başka kişileri HADYEK ten izin almadan iştirak ettirmeyeceğini, çalışmanın başından sonuna kadar başkaları ile paylaşmayacağını ve yayın haline dönüştüğünde belirtilen katkı sırasına göre yayınlayacağını,Üniversitemiz WEB sayfasında güncel hali yayımlanan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak çalışacağını,Onay alınmış Projede belirtilen Deney Hayvanları Kullanımına müsaade edilen kişilerin haricinde başkalarına hayvanlarda herhangi bir Deneysel işlem yaptırmayacağını ve Proje sürecinde işlemlerde ve çalışma ekibinde yapılacak her türlü değişiklikler için HADYEK'e izin başvurusunda bulunacağını ve onay gelinceye kadar çalışmalarını durduracağını,Proje onay tarihinden itibaren her 6(altı) ay sonrasında HADYEK'e gelişim raporu vereceğini ve Proje bitim tarihini müteakiben 3 ay içerisinde çalışma sonucunu HADYEK'e bildireceğini, Bu Proje süresince, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesinde yer alan etik ilkelerle uyumlayan veya beklenmeyen ters bir etki veya olay olduğunda derhal Yerel Etik Kurul'a bildireceğini Kabul ve taahhüt eden kimlik ve iletişim bilgileri yukarıda yazılı yürütücünün Araştırma Projesi, Etik Kurul Üyeleri tarafından OMU HADYEK yönergesi kapsamında Hayvan Hakları ve Deney Etik İlkelerine UYGUN bulunmuştur.		
İMZA Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY Üye	İMZA Prof. Dr. S.Sırrı BİLGE Üye	İMZA Dr. Öğr. Üyesi İsmail Alper TARIM Üye
İMZA Prof. Dr. Umut Sami YAMAK Üye	İMZA Prof. Dr. H. Tahsin KEÇELİGİL Üye	KATILMADI Prof. Dr. N. Umur SAKALLIOĞLU Üye
İMZA Doç. Dr. Gökhan ARSLAN Üye	İMZA Prof. Dr. Aysun GÜMÜŞ Üye	İMZA Doç. Dr. Enes ATMACA Üye
KATILMADI Doç. Dr. Leman TOMAK Üye	İMZA Vet. Hek. Hakan FIDANBOY Üye	İMZA Doç. Dr. Berfin M GÖLCÜ Üye
İMZA Mak. müh. Reşat KURT Üye		KATILMADI Ahmet Ali BULUT Üye
İMZA Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ Başkan		

5070 Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile üretilmiş yazı ekidir. Evrak teyidi <https://ebysorgu.omu.edu.tr> adresinden ilgi yazıda belirtilen kod ile yapılabilir.