

# Polikistik Over Sendromu Oluşturmak için Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

## Experimental Animal Models Used to Develop Polycystic Ovarian Syndrome

 **Aytekin Tokmak**,  **Duygu Tuğrul Ersak**,  **Ayşe Şahin**

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Ankara, Türkiye

### ÖZ

Polikistik Over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda en sık karşılaşılan endokrin ve metabolik bozukluktur. Obezite, dislipidemi, bozulmuş glukoz toleransı ve tip 2 diyabet PKOS'li hastalarda sık görülen önemli klinik sorunlardır. Ayrıca PKOS uzun dönemde kalp damar hastalıkları ve endometriyum kanseri için anlamlı bir risk faktörüdür. Gelişiminde bir takım genetik ve çevresel faktörler bildirilmesine rağmen, altta yatan patofizyolojik mekanizma açık değildir. Jinekolojide aktif bir araştırma alanı bulan PKOS'de, tanı kriterleri üzerinde tam bir fikir birliği olmaması böylesine sık karşılaştığımız sistemik bir bozuklukla ilgili çelişkili yayınların basılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle hastalığın gerçek patogenezinin hayvan modelleri ile ortaya konulması oldukça önemlidir. Bu derlemede amacımız, PKOS oluşturmak için kullanılan deneysel modelleri özetlemektir. Bahsedeceğimiz bu yöntemlerle deneysel olarak overlerde klasik polikistik over morfolojisi oluşturulabildiği ve PKOS'deki çoğu hormonal dengesizliğin izlendiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik Over sendromu, hayvan deneyi, hayvan modelleri, gonadal hormonlar

### ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine and metabolic disorder in women of reproductive age. Obesity, dyslipidemia, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes are important clinical problems in patients with PCOS. Furthermore, PCOS is a significant risk factor for cardiovascular diseases and endometrial cancer in the long term. Although a number of genetic and environmental factors have been reported in the development, the underlying pathophysiological mechanism remains unclear. In PCOS, which has an active field of research in gynecology, the lack of consensus on the diagnostic criteria leads to be published of contradictory publications on such a frequent systemic disorder. For this reason, it is very important to reveal the exact pathogenesis of the disease with animal models. The purpose of this review is to summarize the experimental models used to induce PCOS. It has been observed that classical polycystic ovarian morphology can be formed in these ovaries by experimental methods and many hormonal imbalances observed in PCOS were noticed.

**Keywords:** Polycystic Ovary syndrome, animal experiment, animal models, gonadal hormones

**Geliş tarihi/Received:** 03.10.2018 | **Kabul tarihi/Accepted:** 12.01.2019

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Aytekin Tokmak, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul, Türkiye

**Telefon/Phone:** +90 505 633 50 64 **E-posta/E-mail:** aytekitokmak@gmail.com **ORCID-ID:** orcid.org/0000-0001-5739-5689

**Atıf/Citation:** Tokmak A, Ersak DT, Şahin A. Polikistik Over Sendromu Oluşturmak için Kullanılan Hayvan Deneyi Yöntemleri. Bakırköy Tıp Dergisi 2019;15:333-8 <https://doi.org/10.4274/BTDMJB.galenos.2019.20181003091321>



## GİRİŞ

Polikistik Over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarda yaklaşık %6-14 oranında görülen, sık karşılaşılan bir endokrinolojik/metabolik bozukluktur (1,2). İlk olarak 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından tanımlanmıştır (3). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından 1990 yılında yayınlanan kriterlere göre PKOS tanısı için hastalarda kronik oligo-ovülasyon veya anovülasyona ek olarak klinik veya biyokimyasal olarak gösterilmiş hiperandrojenizm bulguları olması gerekmektedir. Ancak PKOS tanı kriterleri 2003 yılında tekrar gözden geçirilmiş ve Rotterdam tanı kriterleri olarak yayınlanmıştır. Rotterdam'da tanımlanan 3 kriterden 2 veya fazlasını karşılamak PKOS tanısı için yeterli kabul edilmiştir. Bu üç kriter; oligo-anovülasyon, klinik veya biyokimyasal olarak gösterilmiş hiperandrojenizm ve ultrasonografik polikistik over görüntüsüdür (4). Ayrıca PKOS bir dışlama tanısıdır ve androjen yüksekliği, anovülasyona neden olabilecek diğer nedenlerin dışlanması gerekmektedir.

Adrenal hiperandrojenizm, lüteinize edici hormon (LH) hipersekresyonu, *in vitro* fertilizasyonda gonadotropik stimülasyona ovarian endokrin artmış yanıt, endometrial hiperplazi ve endometriyal kanser PKOS hastalarında görülen reproduktif ve endokrin bozukluklardır. Normal kadınlarda %10-15 arasında görülen erken gebelik kayıpları PKOS hastalarında %30-50 arasındadır (5). Bu yüksek gebelik kaybı oranları, insülin rezistansı, obezite, artmış androjenler, endometriyal disfonksiyon ve bozulmuş fibrinolizis ile ilişkilendirilmiştir. PKOS'de ayrıca gebelik sırasında gestasyonel diyabet, gebeliğe bağlı hipertansiyon ve düşük doğum ağırlıklı bebek doğurma riski de artmaktadır (6).

Obezite ve insülin rezistansı PKOS hastalarında yaygın görülmektedir. Obezite sıklıkla bel/kalça oranının arttığı santral obezite tipinde karşımıza çıkarken PKOS görülme sıklığı obezite ile orantılı olarak artmaktadır (7). Bu hastalarda artan vücut kitle indeksi insülin duyarlılığını düşürmekte ve insülin düzeylerini artırmaktadır. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi PKOS'li hastaların yaklaşık %75-80'inde görülmektedir (8). Bozulmuş glukoz toleransı ve tip 2 Diabetes Mellitus da PKOS'de obeziteye eşlik eden metabolik bozukluklardır (9). Bozulmuş glukoz toleransına eşlik eden hiperlipidemi endotelial disfonksiyona yol açmakta ve bu da aterosklerotik vasküler değişiklikler, miyokardiyal disfonksiyon

ve uzun dönemde kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (10). Bunlara ek olarak PKOS'de uyku apnesi, akne, depresyon ve anksiyete gibi ruh hali bozuklukları, azalmış yaşam kalitesi, yeme bozuklukları, kronik enflamasyon ve oksidatif stres de izlenmektedir (11-13).

PKOS gelişiminde rol alan patofizyolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak halen birçok insan ve hayvan çalışmaları bu kompleks hastalığın oluşum mekanizmasının çözülmesi için eş zamanlı olarak yürütülmektedir. Tam olarak insandaki PKOS'ye benzeyen bir hayvan modeli bulunmamakla birlikte farklı teknikler deneysel olarak hayvan modellerinde PKOS oluşturmak için denenmiştir.

Bu hayvan modellerinde ilk olarak dihidroepiandrosteron (DHEA) deneysel olarak PKOS modeli oluşturmak için kullanılmıştır (14,15). Ardından östradiol valerat enjeksiyonu (16), fetal androjen uygulaması (17,18) ve letrozol (19) denenmiştir. Bu yöntemlerle hayvan modellerinde overlerde klasik polikistik morfoloji ve PKOS'deki çoğu hormonal dengesizliğin izlendiği gözlenmiştir.

Bu derlemede amacımız, PKOS oluşturmak için kullanılan deneysel modelleri özetlemektir. Bu modeller;

### a) Dihidroepiandrosteron Uygulaması

Deneysel olarak hayvanlarda PKOS modeli geliştirmek için ilk olarak 1960'lı yıllarda DHEA uygulaması denenmiştir. Roy ve ark. (14) tarafından yapılan çalışmada normal menstrüel sıklusa sahip kobay farelerinde DHEA uygulamasının ardından overlerde kistik dejenerasyonlar ve anovülasyon izlenmiştir. Deneysel olarak uygulanan DHEA için subkütanöz yol tercih edilmiş olup doz aralığı 1,5 mg/kg - 6 mg/kg aralığındadır. Verilen farklı dozlardaki (sırasıyla: 1,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 6 mg/kg) DHEA sonrası hepsinde tipik PKOS ovaryen görünümü elde edilmiştir. On ve yirmi gün DHEA uygulama süresi karşılaştırılmış ve histolojik değerlendirmedeki kistik ve dejeneratif folliküllerin paterni açısından eşit etkili olduğu izlenmiştir. DHEA uygulamasını takiben, folikül stimülan hormon (FSH) ve prolaktin seviyelerinin arttığı, LH seviyesinin azaldığı ve bu sonuçların 3 mg/kg ve 6 mg/kg doz uygulamaları sonrası benzer olduğu izlenmiştir. DHEA uygulama süresi farklı olan hayvan modellerinde de gonadotropin düzeyleri açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir (sırasıyla: 3,7,11 ve 15

gün) (14). DHEA uygulamasını takiben görülen prolaktin konsantrasyonundaki artışın ise overlerde DHEA'nın östrojene dönüşümünün bir sonucu olabileceği düşünülmüştür (20). 1978 yılında Ward ve ark. (15) tarafından yapılan başka bir çalışmada 55 günlük matür ratlar deneye dahil edilmiştir. Non-siklik ratları elimine etmek için en az 2 menstrüel siklus döngüsü için alınan vajinal smearler, steroid uygulaması boyunca devam ettirilmiştir. İlk dizi deneylerde, rat gruplarına subkütanöz yolla 20 gün boyunca günlük (günün 10.00-12.00 saatleri arasında) 1,5, 3, 4,5 veya 6 mg/100 g DHEA bu dozların ovulasyon başarısızlığına ve overde kistik değişikliklere yol açıp açmayacağını belirlemek için uygulanmıştır. Doku hazırlığı için uterus ve overler çıkarılmış ve adventif dokudan temizlenmiştir ardından hematoksilen ve eozin ile boyanmıştır. Serum FSH, LH ve prolaktini, sıçan hormonu ile elde edilen materyaller kullanılarak çift antikor radioimmünoassay tekniği ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, tüm verilen DHEA doz seviyelerinde kistik folliküllerin oluşumu izlenmiştir ve 3 mg'lik DHEA dozu ile 15 günlük tedavi sürecindeki FSH, LH ve prolaktindeki tipik değişikliklerin (FSH ve prolaktin seviyelerindeki artış, LH seviyesindeki azalma) 6 mg'lik dozlarla bildirilenlere benzer olduğu izlenmiştir (15). DHEA uygulamasının kobaylarda insandaki PKOS özellikleri olan anovulasyon, polikistik yumurtalıklar ve hiperandrojenizme neden olduğu izlenmiştir. Ancak, kalınlaşmış bir teka hücre tabakası ile karakterize edilen insan PKOS kistik foliküllerinin aksine, DHEA ile tedavi edilen yumurtalıklarda kistler, ince bir tabaka halinde teka hücrelerini sergilemiştir (21).

### b) Östradiol Valerat Uygulaması

Prepubertal kobay farelerine östradiol valerat uygulanmasının, sempatik ovaryen sinirlerin aktivasyonu ve nörepinefrinin ovaryen ekspresyonunun artması yoluyla over siklusunu bozduğu gösterilmiştir (16,17,22). Rosa ve ark. (22) tarafından yapılan 43 kobayın dahil edildiği çalışmada 0,2 mL mısır yağı içerisinde 2 mg östradiol valerat kobay farelerin çalışma grubuna yaşamlarının 14. gününde kas içi enjekte edilmiştir. Östradiol valerat kaynaklı tirozin hidroksilaz (nörepinefrin biyosentezindeki hız kısıtlayıcı enzim) ekspresyonundaki artışın ve kobaylar puberteye girmeden önce overlerden nöradrenalin salınımının gerçekleşmesi için yeterli zaman sağladığından 14. gün uygulama için seçilmiştir. Bu yapılan çalışmada, prepubertal uygulanan estradiol

valeratın, overde anovulatuvar duruma ve/veya kistik morfolojik değişikliklere yol açıp açmadığı gözlemlenerek östradiol valeratın etkisi araştırılmıştır. Östradiol valeratın indüklediği tirozin kinaz sekresyonuna bağlı artan nöradrenalinin ovulatuvar disfonksiyona yol açtığı ve over siklusunu bozduğu izlenmiştir. Overlerdeki sempatik denervasyon sonrası, PKOS gelişiminin önlenmesinde ovaryen nörepinefrin düzeylerinin azalmasının etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada sıçanlarda östradiol valeratın prepubertal olarak varlığının erken puberte başlangıcına, sempatik ovaryen sinir aktivasyonuna, artmış nöradrenalin sentezine ve kistik ovaryen morfolojisiyle birlikte anovulatuvar duruma yol açtığı sonucuna varılmıştır. Östradiol valerat uygulamasına rağmen, sempatik sinirin denervasyonuna bağlı nöradrenalin salınımının inhibisyonuyla overlerde tipik PKOS oluşumunun önlendiği izlenmiştir. Östradiol valerat uygulamasının dolaşımdaki LH, FSH ve  $\Delta 4$  andrestenedion seviyelerini bastırdığı, ovaryen nörepinefrin ve östradiol (E2) konsantrasyonlarını ise artırdığı izlenmiştir. Kistik ovaryen değişikliklerden artmış intraovaryen noradrenalinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (22).

### c) Fetal Androjen Uygulaması

Erken embriyonik evre gelişimin kritik bir aşamasıdır. Bu aşamadaki herhangi bir kimyasal uyarıcı veya hasar devam etmekte olan gelişim sürecini etkileyebilir ve yaşam boyu devam edecek etkide bulunabilir. Bu erken embriyonik evrede androjen konsantrasyonundaki bir dengesizlik polikistik over gelişimi ile ilişkilidir. Hayvan modellerinde, 21 hidroksilaz eksikliği ve konjenital adrenal virilizan tümörler gibi fetal androjen fazlalığı ile birlikte seyreden durumlarda, kadınlarda artmış PKOS prevalansı izlenmiştir (23-25).

Widdowson ve McCance (26) aşırı androjenin hipotalamohipofizer-gonadal aks üzerindeki etkisiyle üreme fonksiyonlarını bozduğu sonuca varmıştır. Gebe hayvanlara uygulanan artmış androjen uygulamasının, klasik PKOS morfolojisi ve klinik semptomlarına yol açtığı izlenmiştir (27). Abbott ve ark. (17) tarafından yapılan bir çalışmada erkek maymunlarda doğal olarak görülen seviyedeki androjen seviyelerine in utero maruz kalan dişi rhesus maymunlarının, PKOS'ye özgü klinik belirtilere sahip oldukları gösterilmiştir. Wu ve ark.'da (28) sıçanlarda in utero androjen maruziyetiyle kistik ovaryen oluşumları arasındaki ilişkiyi doğrulayacak veri

elde etmişlerdir. Bu çalışmaya dahil edilen her iki sıçan grubuna 3 mg testosteron (T) ve 3 mg dihidrotestosteron (DHT) gestasyonun 16-19. günlerinde her gün subkütanöz yol kullanılarak verilmiştir. Yapılan histolojik incelemede testostere ve DHT'ye maruz kalan çalışma grubunda artmış sayıda preantral follikül izlenmiştir. Gonadotropinlerin biyokimyasal analizinde artmış T ve DHT seviyeleri görülmüştür. Bu görülen hiperandrojenik durum PKOS hastalarıyla benzerdir. Deney grubunda, PKOS hastalarındaki hormonal dengesizliğe benzer şekilde artmış LH seviyeleri izlenmiştir. Androjenlerin anti-östrojenik etkisine bağlı, E2 seviyelerinin azalmış ve E2'nin hipotalamik reseptörler üzerindeki negatif geri bildirim kesintiye uğramıştır. Bu da artan LH konsantrasyonlarıyla sonuçlanmıştır. Gonadotropin stimülasyonuna ve androjenlerin salınmasına bağlı, PKOS'deki klinik prezentasyona benzer şekilde menstrüel disfonksiyon (oligomenorrhoea ve/veya amenore) gözlenmiştir. Araştırmacılar, PKOS'nin karmaşık bir hastalık olduğu ve fazla androjenin PKOS patogenezinin mekanizmasıyla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (28).

#### d) Letrozol Uygulaması

DeneySEL PKOS modeli oluşturmak için bir aromataz inhibitörü olan letrozol de kullanılmıştır (19). Yetişkin sıçanlarda en az 21 ardışık gün letrozol uygulaması sonrası, çok sayıda büyük follikül kisti içeren overler ve korpus luteum yokluğuna veya sayıca azlığına eşlik eden asiklisme, düzensiz menstrüel siklus ve anovülasyon izlenmiştir (19,29,30). Mannerås ve ark. (31) PKOS'nin hem yumurtalık hem de metabolik özelliklerini değerlendirmek için hayvan modelinde çalışmışlardır. Yapılan çalışmada, sıçanlara androjen reseptörlerini aktive etmek için ergenlikten önce başlayarak 90 gün süresince devamlı olarak DHT veya aromataz inhibitörü olan letrozol uygulanmıştır. Çalışmada over morfolojisi, histolojisi, vücut ağırlığı, vücut yağı, mezenterik yağlar ve insulin direnci de değerlendirilmiştir. Letrozol uygulanan tüm ratların anovulatuvar olduğu ve insanda görülen PKOS'dekine çok benzer yapısal değişikliklere sahip polikistik overler geliştirdiği gözlenmiştir. DHT uygulanan ratlarda ise düzensiz siklusla birlikte atretik folliküllerden oluşan polikistik overler gözlenmiştir. Her iki grupta da kistik follikül sayısının arttığı ve kistlerin PKOS hastalarındaki oryantasyonuna benzer şekilde overlerin periferinde yerleştiği izlenmiştir. Beklenildiği

üzere her iki grupta da Testesteron seviyelerinin arttığı, E2 seviyelerinin değişmediği, progesteron seviyelerinin ise azaldığı izlenmiştir. Letrozol grubundan farklı olarak, DHT uygulanan grupta, artmış vücut ağırlığı, vücut yağı ve insulin direnci, yüksek leptin seviyeleri, genişlemiş mezenterik adipositler gibi metabolik özellikler izlenmiştir. Çalışmada, letrozol modelinin PKOS'nin yumurtalık özelliklerine yönelik çalışmaları için uygun olduğu ve DHT modelinin ise hem yumurtalık hem de metabolik özelliklerinin araştırılması için uygun olduğu sonucuna varılmıştır (31).

#### e) Mifepriston (anti-progestin RU-486)

RU486, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerine yüksek afinite gösteren sentetik bir steroiddir. Progesteron reseptörlerine agonistik aktivite göstermeden yüksek antagonistik aktiviteye sahiptir (32). RU486 uygulaması, ratlarda progesteron aktivitesini ortadan kaldırır ve insandaki PKOS'ye benzer endokrin ve ovaryen morfolojik özellikler ortaya çıkarır. RU486'nın 4-9 gün süresince yetişkin dişi ratlara uygulanmasıyla, polistik overler ve anovülasyon izlenmiştir. Overlerde atretik follikül sayısında artış ve granüloza hücre tabakasında incelleme izlenmiştir (33-36). İnsandaki PKOS'ye benzer şekilde serum LH, T ve E2 seviyelerinde artış izlenmiştir (35-37). Farklı modellerde değişken FSH seviyeleri izlenmiştir. RU486 uygulamasının vücut ağırlığını veya insulin duyarlılığını değiştirmediği izlenmiştir (38). Sonuç olarak, ratlara subkütanöz yol kullanılarak implante edilen RU486'nın, siklus bozuklukları, anovülasyon, folliküler kist ve yüksek androjen ve LH seviyelerine yol açtığı düşünülmektedir.

#### f) Fiziksel Etkenler

Harici olarak uygulanan deneysel girişimlerin de PKOS fenotipine benzer üreme özelliklerini uyardığı bildirilmiştir. Kronik soğuk uygulamasının overlerde sempatik sinirlerin aktivasyonu yoluyla morfolojik değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Soğuk stres uygulamasının hipotalamo-hipofiz-adrenal aksdaki lokus coeruleus tarafından düzenleyici bir mekanizma aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (39). Buna ek olarak, sürekli ışığa maruz kalmanın da sirkadiyen sistemi etkileyerek, menstrüel sikluste değişikliklere yol açtığı ve kistik folliküller oluşturduğu izlenmiştir (40). PKOS oluşturmak için kullanılan deneysel modeller ve hormonlar arasındaki ilişki Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1:** Polikistik Over sendromu oluşturmak için kullanılan deneysel modeller ve hormonlar arasındaki ilişki

DHEA	FSH↑, Prolaktin↑, LH↓
Östradiol valerat	LH↓, FSH↓, Δ4 andrestenedion↓, E2↑
Fetal androjen	LH↑, T↑, DHT↑, E2↓
Letrozol	T↑, Progesteron↓
Anti-progestin	LH↑, T↑, E2↑
Soğuk	E2↑, T↑
Işık	T↑

DHEA: Dihidroepiandrosteron, FSH: Folikül uyarıcı hormon, LH: Lüteinize edici hormon, E2: Östradiol, T: Testosteron

## SONUÇ

PKOS fizyopatolojisinin altında yatan mekanizmaları anlamada deneysel modeller önemlidir. Prenatal ve postnatal dönemdeki hormonal dengesizlikler PKOS'yi tetikleyebilir. İntraovaryen sempatik sinir stimülasyonu, mikroçevreyi değiştirebilir ve follikülogenezi bozabilir. Yağlanma fonksiyonel bir yumurtalık işlevinin disfonksiyonel, kistik olana dönüşmesinde rol oynayan bir kofaktör olabilir. PKOS ile ilgili birçok deneysel çalışmaya rağmen, kesin mekanizma henüz açıklığa kavuşturulmamış olsa da deneysel modeller yeni tedavileri değerlendirmek için yararlı olabilir. Çok yönlü bir hastalık olduğu ve çeşitli sistemleri etkilediği için, daha fazla hayvan ve insan çalışmaları yapılmalıdır.

## Etik

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

## Yazarlık Katkıları

Konsept: A.Ş., A.T., Veri Toplama veya İşleme: A.Ş., D.T.E., Analiz veya Yorumlama: D.T.E., A.T., Literatür Arama: A.Ş., D.T., Yazan: D.T.E., A.Ş.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010;25:544-51.
2. Sanchón R, Gambineri A, Alpañés M, Martínez-García MÁ, Pasquali R, Escobar-Morreale HF. Prevalence of functional disorders of androgen excess in unselected premenopausal women: a study in blood donors. *Hum Reprod* 2012;27:1209-16.

3. Stein IF, Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935;29:181-91.
4. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81:19-25.
5. Agacayak E, Tunc SY, Sak S, Basaranoglu S, Yüksel H, Turgut A, et al. Levels of Neopterin and other Inflammatory Markers in Obese and Non-Obese Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Med Sci Monit* 2015;21:2446-55.
6. Homburg R. Pregnancy complications in PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:281-92.
7. Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI, San Millán JL, Escobar-Morreale HF. Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. *Arch Intern Med* 2006;166:2081-6.
8. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
9. Salley KE, Wickham EP, Cheang KI, Essah PA, Karjane NW, Nestler JE. Glucose intolerance in polycystic ovary syndrome—a position statement of the Androgen Excess Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4546-56.
10. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2038-49.
11. Vgontzas AN, Legro RS, Bixler EO, Grayev A, Kales A, Chrousos GP. Polycystic ovary syndrome is associated with obstructive sleep apnea and daytime sleepiness: role of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:517-20.
12. Berni TR, Morgan CL, Berni ER, Rees DA. Polycystic ovary syndrome is associated with adverse mental health and neurodevelopmental outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:2116-25.
13. Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:268-88.
14. ROY S, MAHESH VB, GREENBLATT RB. Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature* 1962;196:42-3.
15. Ward RC, Costoff A, Mahesh VB. The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA). *Biol Reprod* 1978;18:614-23.
16. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 1993;133:2690-5.
17. Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9:62-7.
18. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 2005;11:357-74.
19. Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 2004;35:103-8.



20. Fink G. Oestrogen and progesterone interactions in the control of gonadotrophin and prolactin secretion. *J Steroid Biochem* 1988;30:169-78.
21. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, et al. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol* 2004;64:59-74.
22. Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 2003;144:4289-97.
23. Stikkelbroeck NM, Hermus AR, Braat DD, Otten BJ. Fertility in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol Surv* 2003;58:275-84.
24. Barnes RB, Rosenfield RL, Ehrmann DA, Cara JF, Cuttler L, Levitsky LL, et al. Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1328-33.
25. Phocas I, Chryssikopoulos A, Sarandakou A, Rizos D, Trakakis E. A contribution to the classification of cases of non-classic 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Gynecol Endocrinol* 1995;9:229-38.
26. Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res* 1975;9:154-6.
27. Foecking EM, McDevitt MA, Acosta-Martínez M, Horton TH, Levine JE. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. *Horm Behav* 2008;53:673-92.
28. Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, et al. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J* 2010;57:201-9.
29. Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Pezzone N, Ortega HH. Microscopic characterization of follicular structures in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in the rat. *Arch Med Res* 2006;37:830-9.
30. Zurvarra FM, Salvetti NR, Mason JI, Velazquez MM, Alfaro NS, Ortega HH. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod Fertil Dev* 2009;21:827-39.
31. Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 2007;148:3781-91.
32. Baulieu EE. The antisteroid RU486 its cellular and molecular mode of action. *Trends Endocrinol Metab* 1991;2:233-9.
33. Sánchez-Criado JE, Sánchez A, Ruiz A, Gaytán F. Endocrine and morphological features of cystic ovarian condition in antiprogestosterone RU486-treated rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993;129:237-45.
34. Zhou H, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Naito I, Ohno S. Permselectivity of blood follicle barriers in mouse ovaries of the mifepristone-induced polycystic ovary model revealed by in vivo cryotechnique. *Reproduction* 2008;136:599-610.
35. Ruiz A, Aguilar R, Tébar AM, Gaytán F, Sánchez-Criado JE. RU486-treated rats show endocrine and morphological responses to therapies analogous to responses of women with polycystic ovary syndrome treated with similar therapies. *Biol Reprod* 1996;55:1284-91.
36. Sánchez-Criado JE, Tébar M, Sánchez A, Gaytán F. Evidence that androgens are involved in atresia and anovulation induced by antiprogestosterone RU486 in rats. *J Reprod Fertil* 1993;99:173-9.
37. Ruiz A, Tébar M, Pérez-Romero A, Rol de Lama MA, Sánchez-Criado JE. Serum levels of GH, IGF-I, LH and ovarian steroids in cyclic and RU486-treated rats. *J Endocrinol Invest* 1997;20:611-5.
38. Lakhani K, Yang W, Dooley A, El-Mahdi E, Sundaresan M, McLellan S, et al. Aortic function is compromised in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2006;21:651-6.
39. Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA. Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* 2008;149:2907-16.
40. Baldissera SF, Motta LD, Almeida MC, Antunes-Rodrigues J. Proposal of an experimental model for the study of polycystic ovaries. *Braz J Med Biol Res* 1991;24:747-51.