



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU İLE BESLENMENİN
SIÇAN OVERLERİNDE OLUŞTURDUĞU HASARDA
YAĞ DOKUSU KAYNAKLI KÖK HÜCRE ETKİSİ**

REYIMA ABULIMITI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

MANİSA-2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU İLE BESLENMENİN
SIÇAN OVERLERİNDE OLUŞTURDUĞU HASARDA
YAĞ DOKUSU KAYNAKLI KÖK HÜCRE ETKİSİ**

REYIMA ABULIMITI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Sevinç İNAN

(Jüri Üyesi)

Doç. Dr. Kamil VURAL

(Jüri Üyesi)

MANİSA-2015

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞİ VE YAYIMLAMA İZİN FORMU

Referans No	10087495
Yazar Adı / Soyadı	REYİMA ABULİMİTİ
Uyruğu / T.C.Kimlik No	ÇİN HALK CUMHURİYETİ / 99562345766
Telefon	542406171
E-Posta	rehime1203@yahoo.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu İle Beslenmenin Siçan Overlerinde Oluşturduğu Hasarda Yağ Dokusu Kaynaklı Kök hücrenin Etkisi
Tezin Tercümesi	Effects Of Adipose Drived Stem Cells On Ovary Damage induced By High Fructose Corn Syrup Diet Of Rats
Konu	Histoloji ve Embriyoloji = Histology and Embryology
Üniversite	Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2015
Sayfa	140
Tez Danışmanları	PROF. DR. MEHMET İBRAHİM TUĞLU 29602442896
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu= High Fructose Corn Syrup , Yağ Doku kaynaklı Mezenkimal Kök= Adipose Drived Mezenchymal Stem Cell Hücre, Ovaryum= ovary, Oksidatif Stres= Oxidative Stress, Apoptoz= Apoptosis.
Kısıtlama	36 ay süre ile kısıtlı

Tezimin, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi Veri Tabanında arşivlenmesine izin veriyorum. Ancak internet üzerinden tam metin açık erişime sunulmasının 22.04.2019 tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum. Bu tarihten sonra tezimin, bilimsel araştırma hizmetine sunulması amacı ile Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi tarafından internet üzerinden tam metin erişime açılmasına izin veriyorum. NOT: Erteleme süresi formun imzalandığı tarihten itibaren en fazla 3 (üç) yıldır.

22.04.2016

İmza:.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Reyima ABULIMIT

İmza



TEŞEKKÜR

Tezimi başından sonuna kadar büyük bir titizlikle değerlendiren, tüm yüksek lisans eğitimim sırasında beni hep destekleyen sevgi dolu danışman hocam

Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya

Yüksek lisans boyunca her konuda yardımını esirgemeyen saygı değer hocalarım

Prof. Dr. V. Sevinç İNAN'ya

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'ye

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN'ye

Bilgi ve deneyimleri ile tezime yaptığı katkılardan dolayı çalışma arkadaşlarım

Uzm. Bio. Işıl AYDEMİR'ye

Uzm. Bio. M. Mahmud ÖZKUT'a

Uzm. Bio. Fatma FIRAT'ya

Bio. Dila Hatun SAL'ya

Ar. Gör. Suna SAYGILI'ya

İsmail ÇAYLI'ya

Celal Bayar Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında çalışan, sevgi ve desteği ile beni hiç yabancılik çekirtmeyen tüm diğer arkadaşlarıma

Sevgi ve desteğini benden esirgemeyen

değerli babam ve anneme,

her zaman beni destekleyen eşim ve diğer tüm sevdiklerime,

TEŞEKKÜR EDERİM.

Reyima ABULIMITI

Manisa-2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Beyan	i
Teşekkür	ii
Şekiller Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
Resimler Dizini	vii
Kısaltmalar	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1 Fruktoz	7
4.2 Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu	10
4.3 Fruktoz, obezite ve metabolik sendrom	15
4.4 Fruktoz ve insülin direnci	17
4.5 Ovaryum	21
4.6 Fruktoz ve Kadın İnfertilitesi	25
4.7 Streptozotosin	29
4.8 Kök Hücre ve Kök Hücre Tedavisi	30
4.9 Nitrik Oksit Sentetaz	34
5. GEREÇ VE YÖNTEM	37
5.1 Deney Grubu	37
5.2 Hayvanların Ağırlık Ölçümü	38
5.3 Hayvanların Açlık Kan Şeker Ölçümü	38
5.4 Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücre Kültürü	38
5.5 Vaginal Yayma Hazırlanması ve Grupların Oluşturulması	39
5.6 Parafin Doku Takibi	39

5.7	Hematoksilen-Eozin Boyaması	40
5.8	İndirekt İmmunohistokimya Boyaması	41
5.9	TUNEL İmmunohistokimyası	42
5.10	İstatistiksel Analizler	43
5.11	Histolojik boyamaların skorlanması	43
6.	BULGULAR	45
7.	TARTIŞMA	95
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	108
9.	KAYNAKLAR	110



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 4.1.1 Glikoz ve Fruktozun kimyasal yapısı.	7
Şekil 4.1.2 İntestinden Fruktoz Emilimi.	8
Şekil 4.1.3 Fruktoz metabolizması.	9
Şekil 4.2.1 YFMSŞ üretimi.	11
Şekil 4.4.1 İnsan insülin hormon yapısı. Mavi boyanan A zinciri ve yeşil boyanan B zinciri.	19
Şekil 4.4.2 Fruktozun insülin direnci oluşturma mekanizması.	20
Şekil 4.5.1 Ovaryumun anatomik yerleşimi.	22
Şekil 4.5.2 Ovaryumun histolojik özelliği.	23
Şekil 4.5.3 Dişi Hipotalamus-Pitüiter-Ovaryan aks.	25
Şekil 4.7.1 STZ kimyasal yapısı.	29
Şekil 4.8.1 Totipotent hücrenin yeni bireye kaynaklık etme potansiyeli.	31

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 4.2.1	Şekerlerdeki glikoz ve fruktoz oranları. 12
Tablo 4.2.2	Bazı şeker solüsyonları (%5) ve ilişkili tatlılık dereceleri. 13
Tablo 5.6.1	Parafin doku takip protokolü. 39
Tablo 5.7.1	Hemaoksilen-eozin boyama protokolü. 41
Tablo 5.11.1	H-E boyama sonrası skora kriterleri. 44
Tablo 6.1	Deney Gruplarının VA Verilerinin İstatistiği. 45
Tablo 6.2	Deney Gruplarının AKŞ Verilerinin İstatistiği. 46
Tablo 6.3	Çalışma grupların H-E ile boyama sonrası incelenen kesitlerin morfolometrik analiz sonrası istatistik verileri. 57
Tablo 6.4	e-NOS boyama sonrası morfolometrik analiz istatistik verileri. 66
Tablo 6.5	i-NOS boyama sonrası morfolometrik analiz istatistik verileri. 75
Tablo 6.6	VEGF boyama sonrası morfolometrik analiz istatistik verileri. 84
Tablo 6.7	TUNEL boyama sonrası morfolometrik analiz istatistik verileri. 93

RESİMLER DİZİNİ

		Sayfa No
Resim 6.1	Vücut Ağırlıkları. KG ile karşılaştırıldığında YFMŞ ve STZ gruplarında anlamlı ($P<0,001$) bir azalma olduğu görüldü.	45
Resim 6.2	AKŞ. YFMŞ ve STZ uygulanan gruplarda AKŞ'i belirgin ($p<0,001$) olarak yükseldi. YDKH uygulama sonrası YFMŞ uygulanan gruplarda AKŞ'inde anlamlı ($p<0,001$) düşüş saptandı.	46
Resim 6.3	KG örneklerinde H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), medulla (F), korpus luteum (C) germinal epitel (E) histolojik bulgularında normal bir morfoloji gözlemlendi.	49
Resim 6.4	YFMŞ grubu örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D) ve medulla (C, F), tunika albuginea (E). histolojik bulgularında gelişme geriliği gösteren foliküller ve oosit oluşumuna durumu ve özellik ile medullada konjesyon gösteren vasküler yapılar izlenmekte.	50
Resim 6.5	YFMŞ grubu örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B,)korteks (C, D), tunika albuginea (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında artmış korpus luteum ve daha hafif konjesyon gösteren vasküler yapılar gözlenmekte.	51
Resim 6.6	STZ grubu örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (C, F), histolojik bulgularında büyük kistik Graf folikül ve atrezik foliküller izlendi. Medullada normal bir morfoloji gözlemlendi.	52
Resim 6.7	YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginea (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında iyi gelişmiş graf folikül ve konjesyon özelliği gösteren vasküler içeren medulla gözlemlendi.	53
Resim 6.8	YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginea (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında iyi gelişmiş Graf folikül, hafif kanlanma gösteren medulla morfolojisi gözlemlendi.	54
Resim 6.9	STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay H-E	55

boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında iyi gelişmiş Graf folikül ve normal bir morfoloji gösteren medulla gözlemlendi.

- Resim 6.10** STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında azalmış Graf folikül gözlemlendi. 56
- Resim 6.11** Yüksek fruktoz ve STZ uygulanma sonrası H-E boyamaları ile over dokusu üzerindeki histolojik etkilerinin morfolojik analizinde tüm örnekler incelendiğinde özellikle YFMŞ grubunda overin oldukça etkilendiğini görüldü. 57
- Resim 6.12** oksidatif stress durumunun belirlenmesinde KG over dokuları e-NOS için boyamalarda genel (A), korteks (B, D), tunika albuginya (E) ve medulla (C, F). 58
- Resim 6.13** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMŞ örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F). Medullada ve germinal epitelde artmış e-NOS boyaması izlendi. 59
- Resim 6.14** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMŞ örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 60
- Resim 6.15** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda STZ örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 61
- Resim 6.16** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 62
- Resim 6.17** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 63
- Resim 6.18** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), 64

korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

- Resim 6.19** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 65
- Resim 6.20** YFMŞ ve STZ uygulanma sonrası oksidatif stres için e-NOS boyamaları ile over dokusu üzerindeki etkilerinin morfometrik analizinde tüm örnekler incelendiğinde özellikle YFMŞ grubunda overin oldukça etkilendiğini ve YDKH uygulaması ile birlikte e-NOS ekspresyonun azaldığı görüldü. 66
- Resim 6.21** oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda KG örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), germinal epitel (E) ve medulla (F). 67
- Resim 6.22** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMŞ örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 68
- Resim 6.23** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMŞ örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 69
- Resim 6.24** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda STZ örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 70
- Resim 6.25** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 71
- Resim 6.26** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 72
- Resim 6.27** Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 73

Resim 6.28	Oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	74
Resim 6.29	Uygulama sonrası tüm grupların i-NOS ekspresyonu incelendiği morfometrik analizinde özellikle YFMŞ grubunda overin oldukça etkilendiğini ve YDKH uygulaması ile birlikte i-NOS ekspresyonun azaldığı görüldü. STZ uygulanmasının tüm gruplarda i-NOS üzerine etkisinin hafif olduğu saptandı.	75
Resim 6.30	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda KG örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), germinal epitel ve tunika albuginya (E) ve medulla (C, F).	76
Resim 6.31	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMŞ örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	77
Resim 6.32	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMŞ örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	78
Resim 6.33	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda STZ örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	79
Resim 6.34	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	80
Resim 6.35	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	81
Resim 6.36	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).	82
Resim 6.37	Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde 2. ay kesit	83

görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

- Resim 6.38** Uygulama sonrası tüm grupların VEGF ekspresyonu incelendiği morfolometrik analizinde özellikle YFMSŞ grubunda VEGF ekspresyonunun arttığı ve YDKH uygulaması ile birlikte ekspresyonun azaldığı görüldü. STZ uygulanmasının tüm gruplarda VEGF üzerine etkisinin daha az olduğu saptandı. 84
- Resim 6.39** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında KG örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). Gelişmiş folikülde ve korpus luteumda az sayıda pozitif boyama görüldü. 85
- Resim 6.40** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMSŞ grubu örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F). Bazı sekonder ve graf foliküllerde, germinal epitel ve medullada TUNEL pozitif hücreler izlendi. 86
- Resim 6.41** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMSŞ grubu örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 87
- Resim 6.42** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında STZ grubu örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 88
- Resim 6.43** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMSŞ+YDKH grubu örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 89
- Resim 6.44** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMSŞ+YDKH grubu örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). 90
- Resim 6.45** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında STZ+YDKH grup örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum ve tunika albuginya (C, E) ve medulla (F). 91
- Resim 6.46** Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında STZ+YDKH grup örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika 92

albuginya (E) ve medulla (F).

Resim 6.47 Uygulama sonrası tüm grupların TUNEL boyama sonuçları incelendiği morfometrik analizinde hem YFMŞ grubunda hem STZ grubunda TUNEL pozitif ekspresyonun arttığı ancak STZ grubunda bu artışın daha belirgin olduğu saptandı. Her iki uygulama grubunda YDKH uygulaması ile apoptoz engellendi. 93



KISALTMALAR

Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu	YFMS
Kök Hücre	KH
Embriyonik Kök Hücre	EmKH
Erişkin Kök Hücre	ErKH
Glikoz Taşıyıcı	GLUT
İn Vitro Fertilizasyon	IVF
İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	İSSİ
Yağ Doku kaynaklı KH	YDKH
Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz	eNOS
İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz	iNOS
Adenozin Trifosfat	ATP
Adenozin Monofosfat	AMP
Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre	KİMKH
Streptozotisin	STZ
Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein	VLDL
Düşük Yoğunluklu Lipoprotein	LDL
Düşük Yoğunluklu Lipoprotein-Kolesterol	LDL-K
Direkt Düşük Yoğunluklu Lipoprotein	DLDL
Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein	HDL
Laktaz Dihidrogenaz	LDH
United States Department of Agriculture, ABD Tarım Bakanlığı	USDA
Gastrik İnhibitör Polipeptid	GİP
Vazoaktif İntestinal Polipeptid	VİP
Kolesistokinin	CCK
C-jun NH(2)-terminal Kinaz	JNK
İnsülin Reseptör Substrat-1	IRS-1
Tümör Nekrozis Faktör- α	TNF-α
Reaktif Oksijen Türleri	ROS
Hemoglobulin A1c	HbA1c
Homeostatik Model Değerlendirme	HOMA
Yüksek-sensitivite C-reaktif Protein	hs-CPR
Polikistik Over Sendromu	PKOS
Kantitatif İnsülin Sensitivite Kontrol İndeks	QUICKI
Oral Glikoz Tolerans Testi	OGTT

İnsülin Tolerans Testi	İTT
Hepatik Glutasyon	GSH
Malondialdehit	MDA
Gonadotropin Salgılayıcı Hormon	GnRH
Folikül Stimüle edici Hormon	FSH
Lutenizasyon Hormon	LH
İnsan Koriyonik Gonadotropin	hCG
Konjental Adrenal Hiperplazi	KAH
Prematür Over Yetmezliği	POF
İn Vitro Matürasyon	IVM
Adrenokortikotropik Hormon	ATCH
Siklik Guanozin Monofosfat	cGMP
Diaminobenzidin	DAB
Transforming Growth Factor, Değişici Büyüme Faktörü	TGF-β
Trigliserid	TG
Aspartat Aminotransferaz	AST
Alanin Transaminaz	ALT
Oksidatif Stres İndeks	OSI
Ovaryan Hiperstimulasyon Sendrom	OHSS
İnsülin Büyüme Faktör	IGF
İnsülin Büyüme Faktör-Bağlayıcı Protein	IGF-BP
Yüksek Mobilite Grup Box, High-Mobility Group Box	HMGB
Tümör Nekrozis Faktör ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand	TRAIL
Nükleer Faktör-KappaB	NF-κB
Dehidroepiandrosteron	DHEA
Yeşil Floresan Protein, Green Fluorescent Protein	GFP

Başlık: Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu İle Beslenmenin Sıçan Overlerinde Oluşturduğu Hasarda Yağ Dokusu Kaynaklı Kök hücrenin Etkisi

Öğrencinin adı: Reyima ABULIMITI

Danışman: Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

1.ÖZET

Amaç: Son zamanlarda şekerli beslenme toplum sağlığı açısından önemli bir problem oluşturmakta özellikle mısır şurubu gibi ucuz şekerlerden yapılan tatlılardan şişmanlık ve şeker hastalığını da içeren üreme sağlığını etkileyen hastalıklara neden olmaktadır. Kök hücrenin rejeneratif tıp alanında kullanımı tedavi biçimini almış ve birçok farklı hastalıklar için de deneysel olarak incelenmeye başlanmıştır. Bu çalışmada Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre (YDKH) uygulamasının Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (YFMŞ) ile sıçan over dokusunda oluşan hasar sonrası iyileşme sürecine olan etkisini belirlemek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Wistar dişi sıçanlar kullanıldı. Her grupta 4 hayvan olacak şekilde sıçanlar 6 gruba ayrıldı. 1.Grup: Kontrol grubu; 2.Grup: YFMŞ grubu; 3.Grup: STZ grubu; 4.Grup: Sham grubu; 5.Grup: YFMŞ + YDKH grubu; 6.Grup: STZ + YDKH grubu. Kontrol ve STZ uygulanan gruplar dışında diğer gruplar YFMŞ içeren içme suyu ile beslendi. YDKH uygulanan gruplara haftada bir kez 1×10^6 /ml YDKH intraperitoneal olarak enjekte edildi. Sham grubuna eşit miktarda hücre kültür besiyeri enjekte edildi. Deney öncesi ve sonrası hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Açlık kan şekerleri (AKŞ) deney öncesi ve 4 haftada bir kez ölçüldü. Deney sonrası hayvanların over dokuları toplandı. Histolojik değerlendirmeler ve oksidatif stres açısından eNOS, iNOS antikorları ile, damarlanma durumunun belirlenmesi için VEGF antikorları ile apoptoz açısından TUNEL boyamalarında immünohistokimya değerlendirmeleri yapıldı. İstatistiksel analizler için ANOVA testi yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızda YFMŞ ve STZ uygulanan sıçanların vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) azalış gösterdiği bulundu. YFMŞ uygulama sonrası sıçanların kan şekeri ortalama yüksek olup kontrol gruptaki ortalama düzeyden anlamlı ($p < 0,001$) olarak arttığı gözlemlendi. YDKH uygulama sonrası YFMŞ ile beslenen sıçanların ağırlıkları YDKH uygulanmayan grup ile karşılaştırıldığında belirgin ($p > 0,05$) bir fark göstermez iken AKŞ düzeylerinde

anlamli ($p<0,001$) bir dūşūş saptandı. STZ uygulanan gruplarda da YDKH uygulama sonrası AKŞ dūzeyi belirgin ($p<0,001$) bir dūşūş gösterdi. Histolojik incelemede YFMŞ ve STZ uygulanan gruplarda folikūl sayısında azalma, konjesyon gōsteren stroma gibi patolojik sonuēlar bulundu. İmmūnohistokimyasal incelemeler sonucu YFMŞ ve STZ uygulanan gruplarda oksidatif stres aēısından eNOS ve iNOS ekspresyonların arttıēı, VEGF ekspresyonunun arttıēı bunun ile beraber ozellik ile YFMŞ uygulanan gruplarda bu artışların daha belirgin ($p<0,001$) olduēu saptandı. Apoptozun belirlendiēi TUNEL boyamalarında STZ uygulanan gruplarda daha belirgin ($p<0,001$) bir hūcre olūmünün ortaya ēıktıēı anlaşıldı. YDKH uygulama sonrası patolojik deēişikliklerin azaldıēı bulundu.

Sonuē: YFMŞ tūketilmesinin deneysel sıēan modelinde hiperglisemiye yol aētıēı aynı zamanda over dokusunda patolojik bozukluklara neden olduēu gōsterildi. Bu patolojik bozuklukların serbest radikallerin ve ona paralel hūcre olūmünün artması ile ortaya ēıktıēı gōsterildi. YDKH'nin YFMŞ ve STZ uygulama sonrası oluşan metabolik ve patolojik bozukluklara iyileştirme etkisinin olduēu bunu oksidatif stres ve beraberinde gelişen apoptozu azaltıp damarlanmanın azalması ile gerēekleştirdiēi saptandı.

Anahtar Kelimeler: Yüksek Fruktozlu Mısıır Şurubu, Yaē Doku Kaynaklı Kōk Hūcre, Over, İnsūlin Direnci, Oksidatif Stres, Apoptoz.

Title: Effects Of Adipose Drived Stem Cells On Ovary Damage induced By High Fructose Corn Syrup Diet Of Rats

Student name: Reyima ABULIMITI

Supervisor: Prof. Dr. M. Ibrahim TUGLU

Department: Department of Histology and Embryology

2. SUMMARY

Purpose: Consumption of high sugar diet becoming a major health problem among society recently. Especially consumption of foods using cheap sweeteners such as corn syrup is leading to diseases like obesity and diabetes which relates to reproduction functions. Stem cells have taken the form of treatment to use in regenerative medicine and have started to be studied experimentally for many different diseases. Aim of this study is to investigate the effects of Adipose Drived Stem cells (ADSCs) on the healing period of rat ovary damaged with High Fructose Corn Syrup (HFCS) diet.

Materials and Methods: Wistar female rats were used in this study. Rats divided into 6 groups with 4 animals in each group. Group 1: Control group; Group 2: HFCS group; Group 3: STZ group; Group 4: Sham group; Group 5: HFCS + ADSC group; Group 6: STZ + ADSC group. Except the control group and STZ group all other three groups fed with HFCS containing drinking water. ADSCs injected weekly in 1×10^6 /ml doses intraperitoneally to ADSC treated groups. Equal amounts of cell culture media was injected into the sham group. The weights of the animals were measured before and after the experiment. Fasting blood glucose (FBG) test were measured before the experiment and once in 4 weeks. Ovaries of all animals collected at the end of the experiment and used to histological and immunohistochemical examination. In terms of oxidative stress in the ovary, indirect immunohistochemical staining is applied using the primary antibodies with eNOS, iNOS for oxidative stress, VEGF for vascularization and TUNEL staining is applied for apoptosis. Statistical analysis was performed by ANOVA test.

Results: In our study, body weights of HFCS and STZ treated rats are found to decrease significantly ($p < 0,001$) compared to the control group. HFCS treated rats had more FBG level which is significantly ($p < 0,001$) higher than that of control group. Body weights of rats in HFCS + ADSC group show no difference ($p > 0,05$) compared to not ADSC treated HFSC group but FBG levels were significantly ($p < 0,001$) decreased after

ADSC application. In STZ treated group FBG levels also significantly ($p < 0,001$) decreased with ADSC application. In histological examinations of ovary sections it was shown that reduced follicular numbers were found in HFCS and STZ treated groups as well as a congestion in the stroma. Immunohistochemical staining showed increased eNOS, iNOS expression in HFCS and STZ treated groups which indicates increased oxidative stress, VEGF expression is also increased. We observed that these increased expressions are more significant ($p < 0,001$) in HFCS group. In TUNEL immunohistochemical staining it turns out that significantly higher cell death occurred in STZ treated group and the pathological changes are decreased with the ADSC treatment.

Conclusion: It showed that HFCS consumption leads to hyperglycemia as well as pathological disorders in ovarian tissues in rats. Formation of these pathological and metabolic disorders may be related to the increased free radicals and followed cell death. ADSC application to HFCS and STZ treated rats improved the metabolic and pathological disorders by reducing oxidative stress and apoptosis as well as decreasing increased vascularization.

Key Words: High Fructose Corn Syrup, Ovary, Insulin Resistance, Oxidative Stress, Adipose Driven Stem Cells, Apoptosis.

3. GİRİŞ

İnfertilite herhangi bir doğum kontrolü yöntemi uygulamaksızın, 1 yıl süreyle, düzenli ilişkiye rağmen gebe kalamama durumudur (Zegers-Hochschild 2009). İnfertilite nedenlerinin %30'u kadına ait sebeplerden ortaya çıkmaktadır ve bunun da overdeki bozukluklar nedeni ile ortaya çıkan ovulasyon bozuklukları kadın infertilitesinin %30'unu oluşturmaktadır (Unuane 2011). Modern dünyada infertilite giderek artan bir problem olmaktadır. İnfertilitedeki bu artışa çevresel faktörlerin özellikle tatlandırıcı kullanılan gıdaların tüketimin artmasının neden olduğu düşünülmektedir. Bu gıdaların tüketimi üreme organları ve hücreleri üzerine gittikçe artan bir şekilde olumsuz etki göstermektedir. Bu durum günümüzde artan infertiliteyi etkileyebileceği düşünülmektedir (Gözükaya 2013; Chaffin ve ark. 2014; Yaakov 2014).

Fruktoz ve fruktoz bazlı tatlandırıcılar günümüzde yiyecek ve içeceklere en fazla eklenen tatlandırıcılardır. Üretimini kolay ve maliyetinin ucuz olması nedeni ile son yirmi otuz yılda gıda sektöründe tercih edilen tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ancak insan ve hayvan çalışmaları fruktozun aşırı tüketilmesinin metabolizmayı olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Fruktozun aşırı tüketimi ile obezite ve diyabet olanların artışının ilişkili olduğunu düşünen araştırmacılar fruktoz kullanım zamanının, dozunun ve diğer şekerler ve yağlar ile etkileşiminin fruktozun etki mekanizmasının ortaya çıkması için önemli olduğunu ileri sürmektedir. Daha da önemlisi doğum öncesi ve erken postnatal dönemlerde tatlandırıcı eklenen yiyecek ve içeceklere maruz kalan bebek sayısı artmaktadır ve bu durum perinatal maruziyetin uzun süreli etkilerini vurgulamaktadır. Ancak tatlandırıcı kullanılan yiyecek ve içecek tüketiminin kötü gebelik sonuçları ile olan ilişkisini gözlemleyen veya kontrol eden insan çalışmaları henüz mevcut değildir. Hayvan deneyleri bu diyet tarzının artan gastasyonel diyabet, maternal, fetal ve yeni doğan metabolik fonksiyon değişikliklerine yol açtığını göstermiştir (Memon ve Kumar 2013). Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (YFMSŞ) glikozun fruktoza izomerizasyonu ile elde edilmiştir. %90 fruktoz, %10 glikoz içeriren YFMSŞ-90 birçok tatlandırılmış içecekte yaygın olarak kullanılır. Son zamanlardaki çalışmalar özellikle fruktoz eklenmiş yiyecek ve içeceklerin tüketiminin metabolik sendroma ve insülin rezistansına yol açması ve bu hastalıkların overdeki patolojik bozukluklara yol açtığını özellikle

polikistik over sendromunda merkezi rol oynadığını ortaya koymuştur (Regnault 2013).

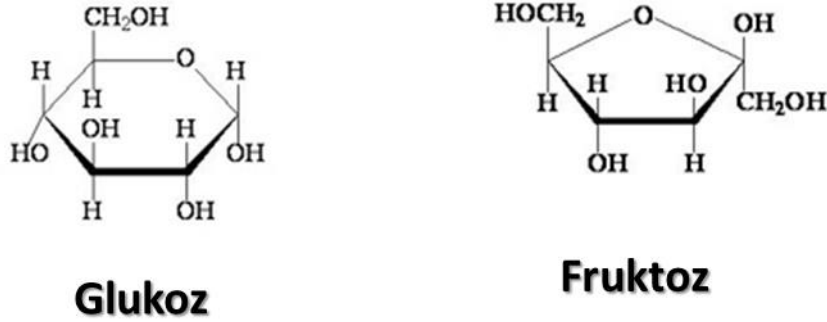
Günümüzde çeşitli infertilite nedenlerine bağlı olarak farklı tedavi yöntemleri uygulanmakta olsa bile en yeni olarak İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (İSSİ) yöntemleri kullanılmaktadır. İSSİ yönteminde canlı bebek oranı maalesef %16~%22 civarındadır (Sherins ve ark. 1995; Kyrou ve ark. 2011). Bu neden ile yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kök Hücre (KH) uygulamaları günümüzde yeni ortaya çıkan tedavi yöntemidir. KH organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu kolayca elde edilen ve faktörler aracılığı ile farklılaştırılabilen öncül hücrelerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu KH'ler için bizatihi kendilerinin dışında salgıladığı faktörler ile niş oluşturarak özellikle kanser hücrelerinde olmak üzere diğer hücreleri olumlu yönde etkiledikleri bildirilmektedir. YDKH erişebilirliğinin kolay olması ve kaynağın fazla olması açısından avantajlıdır. embriyonik KH (EmKH) gibi etik problemler yoktur. Bu neden ile çalışmamızda YDKH tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır (Lauritano D 2014).

Çalışmamızda yetişkin dişi sıçanlara 2 ay boyunca YFMŞ eklenen içme suyu verilerek sıçan over dokusunda oluşturduğu hasarın belirlenmesi amaçlandı. Bu oluşan hasar sonrasında YDKH'nin overdeki hasarın iyileşme periyoduna ve bu sırada gerçekleşen oogeneze etkisi incelenerek yeni tedavi yöntemlerin ortaya çıkması ileri sürüldü.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Fruktoz

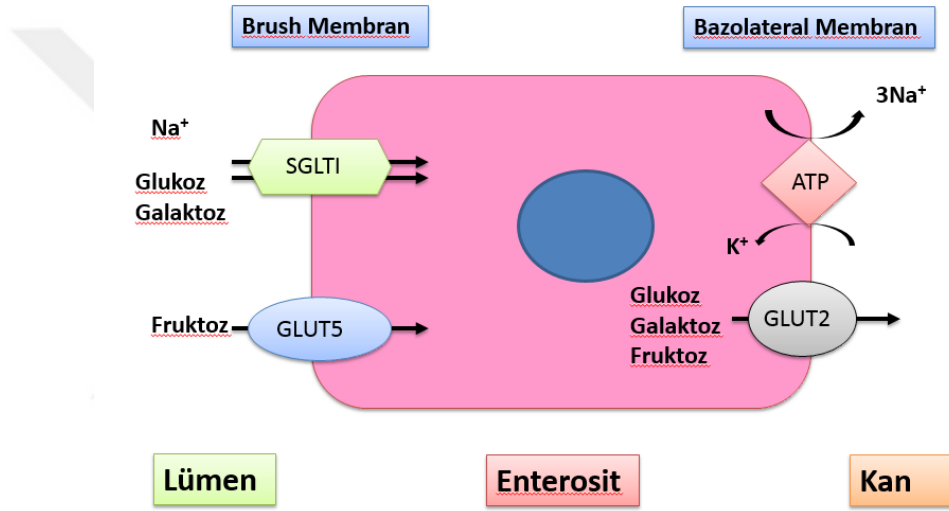
Fruktoz önemli bir besinsel monosakkarittir. Kimyasal formülü $C_6H_{12}O_6$ olup glikozdan farklıdır (Şekil 4.1.1). Tatlandırıcı olarak kullanılan esas şekerdir. Fruktoz; meyve şekeri olarak da bilinir. Meyvelerde, balda, disakkarit olan sukrozda ve YFMS’de bulunur (Memon ve Kumar 2013). En önemli fruktoz kaynağı hazır gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan YFMS’dir. Fruktoz glikoz ile aynı enerji yüküne sahiptir. Açlık kan fruktozu 1 mg/dL düzeyindedir (Bulut ve Mir 2011).



Şekil 4.1.1. Glikoz ve Fruktozun kimyasal yapısı (Lab Cat 2009. <https://cdavies.wordpress.com/2009/01/27/simple-sugars-fructose-glucose-and-sucrose/>).

Fruktozun absorpsiyonunda karbonhidratlar intestinal brush border hidrolaz enzimleri ile monosakkaritler olan glikoz, galaktoz ve früktoza parçalanırlar ve daha sonra absorbe edilirler. Fruktoz genel olarak glikoz veya sukroz ile beraber alınır ve daha iyi absorbe edilir (Laughlin 2014). Fruktoz apikal membrandan enterositlerin yüzeyindeki taşıyıcı GLUT-5 aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyonla (Şekil 4.1.2) alınır (Uldry 2004). Bu işlem ATP hidrolizi gerektirmez ve sodyum emiliminden bağımsızdır. GLUT-5’in düşük afiniteli fakat yüksek kapasiteli bir früktoz taşıyıcı olduğu bildirilmiştir (Jones ve ark. 2011). Glikoz ve galaktozun aksine, fruktoz gastrik boşalmayı geciktirerek gıda alımını inhibe edebilir ve yavaş bir şekilde absorbe olmasına öncülük eder. Glikoz ve/veya fruktoz GLUT-2 mRNA

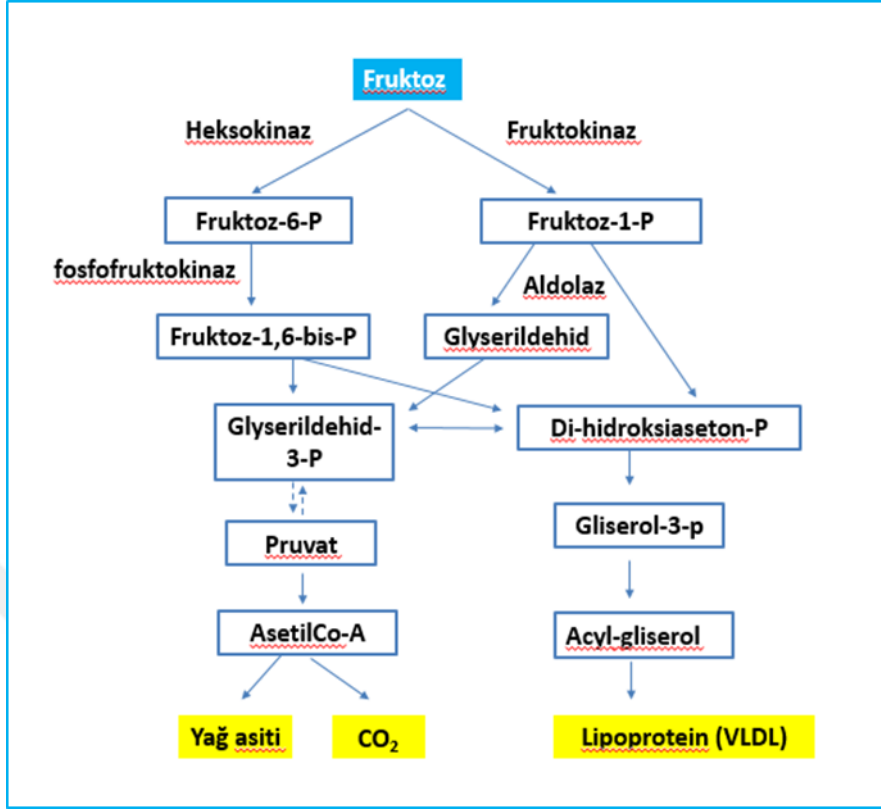
ekspresyonunu artırabilir. Oysa GLUT-5 mRNA transkripsiyonu sadece fruktoz tarafından artırılır ve böylece fruktoz kendi absorpsiyonunu artırır. Glikoz ve/veya galaktozun fruktoz absorpsiyonunu artırdığı çalışmalarda gösterilmiştir. Mekanizması net olarak anlaşılamasa da glikoz varlığında iki monosakkaritin disakkaridaz ilişkili transport sistemi ile kombine olarak absorbe olduğu ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalar glikozun pasif difüzyon yoluyla fruktoz emilimini artırdığını savunurken, diğerleri intestinal lümende artan fruktoza yanıt olarak brush border membrana GLUT-2 desteği yapıldığını savunmaktadır (Mueckler 2013).



Şekil 4.1.2. İntestinden Fruktoz emilimi (Jones ve ark. 2011).

Özetle fruktoz glikozdan farklı bir transport sistemi kullanır ve hem glikoz varlığında hem de fruktoz varlığında fruktoz emilimi artar. Bu veriler özellikle YFMSŞ, sukroz ve bal gibi hem glikoz hem fruktoz içeren gıdaların sindirimi sırasında fruktoz emiliminin daha fazla olabileceğini düşündürmektedir (Erejuwa 2012).

Fruktoz Metabolizmasında transport ve metabolizması insülin bağımlı değildir, metabolizması hızlıdır ve böbrek eşik değeri düşüktür. Büyük bir kısmı karaciğerde olmak üzere bağırsak, kas ve yağ dokusunda metabolize edilir. Genel olarak fruktoz iki farklı şekilde glikolitik yola girer (Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.3. Fruktöz metabolizması (Tappy ve Kim-anne 2010).

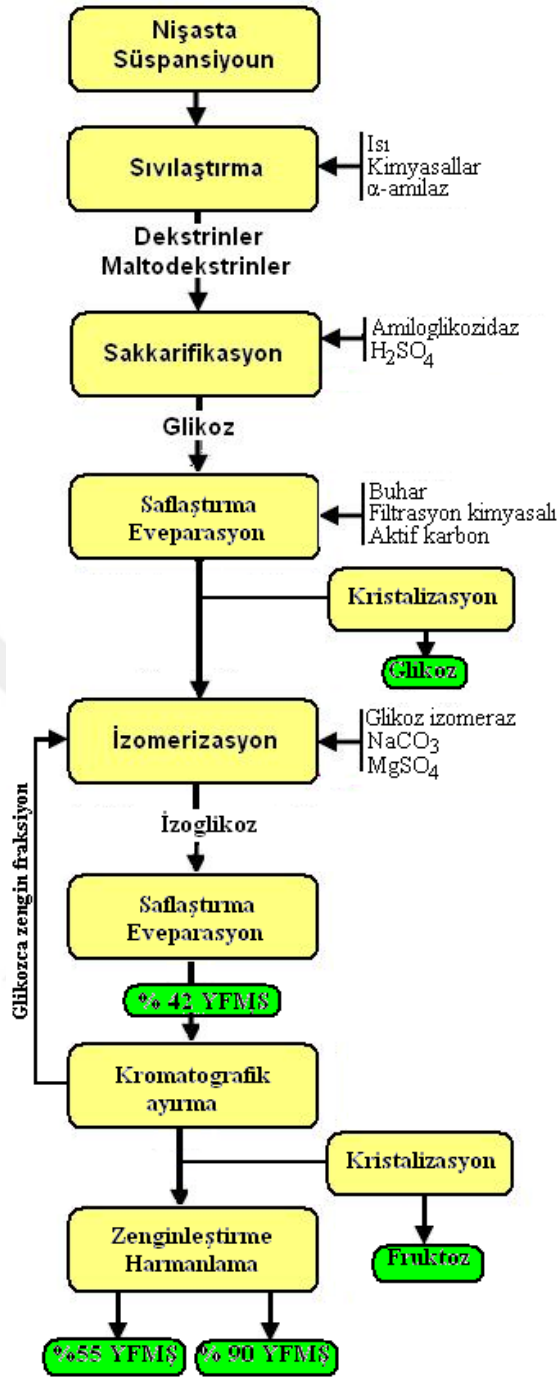
Birinci yol olarak karaciğerde fruktoz fruktokinaz tarafından fosforillenerek fruktoz 1-fosfat'a çevrilir. Fruktoz 1-fosfat daha sonra fruktoz-1 fosfat aldolaz (Aldolaz B) tarafından dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehite çevrilir. Dihidroksiaseton fosfat bir izomeraz etkisi ile gliseraldehit 3-fosfata dönüşebildiği gibi, gliseraldehit bir kinaz etkisiyle de gliseraldehit 3-fosfata dönüşebilir. Daha sonra bu iki trioz fosfat aldolaz enzimi ile birleştirilir ve sırasıyla fruktoz 1,6-bifosfat, fruktoz 6-fosfat ve glikoz 6-fosfat oluşturur. Fruktoz 1-fosfatın glikoliz ara maddelerine dönüşümünde heksokinaz ve fosfofruktokinaz 1 reaksiyonları devre dışı kaldığı için fruktoz karaciğerde glikoza oranla çok daha hızlı metabolik değişime uğramaktadır (Laughlin 2014; Tappy ve Kim-anne 2010).

İkinci yol olarak ise karaciğer ve kas yakıt olarak öncelikle glikozu kullanır. Heksokinazın fruktoza olan ilgisi, glikoza olan ilgisinin 1/20'si kadar olduğu için karaciğerde ve kaslarda çok az fruktoz-6 fosfat oluşur. Yağ dokusu bu nedenle daha

fazla fruktoza maruz kalır ve bu dokuda fruktoz heksokinaz tarafından fruktoz 6-fosfata dönüştürülerek fosforillenir (Memon ve Kumar 2013). Fosforilasyon sırasında adenozin trifosfat (ATP) tükenir ve intrasellüler fosfat düzeyi azalır. Bu basamak glukokinaz ile olan glikozun fosforilasyonundan farklıdır. Glikoz metabolizmasında, ATP tükenmesi ve aşırı fosforilasyon bir feedback sistemi olarak hız kısıtlayıcı enzim aracılığıyla önlenir (Havel 2005). Fruktoz ise glikozdan farklı olarak; devam eden reaksiyonlar ile ya glukoneogenez ile glikoz oluşumuna ya da de novo Trigliserid (TG) sentezine yönlendirilir. Bu durum glikoz metabolizmasına göre farklıdır (Tappy ve Kim-anne 2010). Fruktozun fruktoz-1-fosfata dönüşümü aşamasında hız kısıtlayıcı enzim etkisi yoktur. Bu nedenle fruktoz kaynaklı ara metabolitler glikoliz yoluna dahil olarak gliserol ve yağ asidi sentezinde kullanılır ve trigliserid oluşumuna neden olurlar. Yüksek miktarda fruktoz tüketimi sonucunda da; serum yağ asidi düzeyleri artar ve insülden bağımsız yağ depolanmasına neden olarak obesiteye özellikle de abdominal bölgede yağlanmaya neden olur (George ve ark. 2004; Forshee ve ark. 2007). Ayrıca karaciğerde piruvat ve laktat üretimini artırır, glikoz toleransını düşürür, insülin direncini artırır ve serbest yağ asitlerinin dengesini oksidasyondan esterleşme yönüne çevirerek Çok Düşük Yoğunluk Lipoprotein (VLDL) sekresyonunu artırır. Fruktozun metabolize edilmesi sırasında intrasellüler ATP azalması görülür ve adenozin monofosfat (AMP) sonunda ürik aside dönüşür. Fruktoz alımından sonraki 30-60 dakika içerisinde ürik asit yalnızca hücre içerisinde değil aynı zamanda dolaşımda da artar (Tornheim ve Lowenstein 1976; Sun ve Empie 2012).

4.2 Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu

YFMS sukroza alternatif olarak üretilen sıvı bir tatlandırıcıdır. YFMS sukrozdan daha ucuzdur ve bazı gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır. Bu nedenle de gazlı ve meyveli içecekler, çikolata, kek, şekerleme, reçel, marmelat ve jöle gibi birçok işlenmiş üründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 1970'den günümüze YFMS tüketimi önemli derecede artmıştır. Kimyasal ve enzimatik hidroliz teknikleri kullanılarak sıvılaştırma, parçalama ve izomerizasyon aşamaları ile mısır nişastasından üretilmektedir (**Şekil 4.2.1**).



Şekil 4.2.1. YFMŞ üretimi (Karaoğlu 2011).

Karmaşık bir işlem sonunda farklı fruktoz içeriklerine sahip 3 farklı şurup elde edilir (Parker ve ark. 2010). YFMŞ-90 %90 fruktoz, %5 glikoz, YFMŞ-55 %55 fruktoz, %42 glikoz, YFMŞ-42 %42 fruktoz,% 53 glikoz (Karaoğlu 2011) içerir (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1. Şekerlerdeki glikoz ve fruktoz oranları (Karaoğlu 2011).

Şeker	Glikoz	fruktoz	Diğer
Sukroz	%50	%50	%0
YFMŞ-90	%5	%90	%5
YFMŞ-55	%42	%55	%3
YFMŞ-42	%53	%42	%5
Bal	%43	%49	%5

YFMŞ'nun kalan kısmını bağlı glikoz, maltoz (di-glikoz) ve maltotrioz (tri-glikoz) oluşturur (White 2008). Hem YFMŞ-55 hem YFMŞ-42 farklı tatlılık dereceleri nedeni ile çeşitli yiyeceklerde kullanılmak üzere gıda üreticileri tarafından kullanılmıştır. Sukrozdan daha fazla fruktoz içermesi nedeniyle daha lezzetli olan YFMŞ-55 özellikle gazlı içecekler, meyve suları, çikolata, kek, şekerleme, reçel, marmelat ve jöle gibi geniş bir kullanım alanı bulmuştur. YFMŞ-42 ise daha hafif bir tatlandırıcı olduğundan ve doğal tatları maskeleyemediğinden baharat, sos, çorba, konserve meyve gibi işlenmiş gıdalarda daha yaygın kullanılmaktadır (Parker ve ark. 2010). 1960'ların ortasına kadar sukroz (%50 fruktoz, %50 glikoz) yiyecek ve içecek endüstrinde en sık kullanılan tatlandırıcıyken, takip eden yıllarda gıda endüstrinin gelişmesi ve YFMŞ üretimindeki artışla birlikte YFMŞ işlenmiş gıdalardaki sukrozun yerini almıştır (Melanson ve ark. 2008).

YFMŞ'nin tatlandırıcı olarak tanıtılmasından çok kısa süre sonra geniş bir kullanım alanı bulmasındaki ilk etken fiyatının sukrozdan daha ucuz olması sayılabilir. Günümüzde Amerika'da tatlandırıcı kullanılan yiyecek ve içeceklerin %40'ında tatlandırıcı olarak YFMŞ bulunmaktadır. Sukrozda eşit miktarda glikoz ve fruktoz birbirine glikozitik bağlarla bağlıdır, metabolizması sırasında bu bağlar koparak monosakkarit bileşenlerine dönüşerek metabolize edilir. Oysa YFMŞ serbest fruktoz ve glikoz içerdiğinden vücutta daha hızlı metabolize olmaktadır. Fruktoz sukrozdan daha tatlıdır (Tablo 4.2.2). Tatlılık derecesi sukroz

için 1,0 kabul edildiğinde, glikozun tatlılık derecesi 0,56, fruktozunki ise 1,3'tür (Parker ve ark. 2010).

Tablo 4.2.2. Bazı şeker solüsyonları (%5) ve ilişkili tatlılık dereceleri (Parker ve ark. 2010).

Şekerler	İlişkili tatlılık dereceleri
Sukroz	1,0
İnvert şeker	0,85-1,0
Glikoz	0,56
Fruktoz	1,3
Galaktoz	0,4-0,6
Maltoz	0,3-0,5
laktoz	0,2-0,3

Ancak YFMŞ tatlılık derecesi sukrozdaki daha düşük olan glikoz içerdiğinden hem YFMŞ-42 hem YFMŞ-55 sukrozdaki daha az tatlıdır. White (2008) YFMŞ ile ilgili yazdığı derlemede de referans olarak kristalize sukrozun tatlılığını 100 aldıklarında kristalize fruktozun tatlılığını 117, YFMŞ-55'in tatlılığını 99 bulmuşlardır. İçinde sukroza göre daha fazla fruktoz bulunmasına rağmen YFMŞ-55'in tadının sukrozdaki daha az olmasını anlamak zordur (George ve ark. 2004).

2008 yılında Amerika'da ABD Tarım Bakanlığı (United States Department of Agriculture, USDA) verileri incelenerek yapılan çalışmada 1970 ile 1999 yılları arasında YFMŞ tüketiminin %1000 artış gösterdiği saptanmıştır. 2 yaş ve üzeri Amerikalılarda günlük YFMŞ tüketimi kişi başına 50g veya kişi başına 189kcal olarak gösterilmiştir. Amerikada diyetle alınan fruktozun ana kaynağı YFMŞ'dir (Parker ve ark. 2010).

2006 yılı itibarı ile dünyada yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi yaklaşık 12,5 milyon ton iken, Türkiye'de 2010 yılı itibarı ile 400 bin ton civarındadır. Avrupa Birliği ülkelerinde nişasta bazlı şeker için ortalama %2'lik kota bulunurken, şeker pancarından şeker üretiminde birinci ve ikinci sırayı paylaşan ülkelere Fransa'da bu oran %0,42, Almanya'da ise %0,89'dur. Türkiye'de ise 2001 yılında çıkarılan Şeker Yasası ile nişasta bazlı şeker kotası %10 olarak belirlenmiş ve Bakanlar

kuruluna bu miktarı %50 artırma ve azaltma yetkisi verilmiştir. Bakanlar Kurulu da bu yetkiye dayanarak nişasta bazlı şeker kotasını %15'e çıkarmıştır (Karaoğlu 2011).

YFMŞ tüketimindeki artış ve buna ek olarak artan obezite ve diğer metabolik hastalıklar araştırmacıları YFMŞ'nin sağlık açısından olası olumsuz etkilerini araştırmaya itmiştir. Son otuz yılda obezite, kardiyovasküler hastalık ve metabolik sendrom insidansı artışına YFMŞ tüketimindeki artışın sebep olduğunu ileri süren çalışmalar son 10 yıl içinde yayınlanmıştır. Ancak YFMŞ ve sukrozun metabolik etkileri arasındaki farkın net olarak ortaya konmadığını, YFMŞ'nin doğrudan obeziteye sebep olmadığını, asıl problemin genel popülasyonun yüksek kalorili besin tüketmesi ve hareketsiz yaşam sürdürmesi olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (Parker ve ark. 2010).

Çok sayıdaki çalışmada YFMŞ ile obezite, diyabet ve metabolik sendrom ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaların en önemli bulguları şunlardır; kilo alımı ve obezite, insülin direnci gelişimi, lipogenez ve trigliserid artışı, non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, gerekenin üzerinde kalori alımı sonucu leptin direnci ve düzenlenme yeteneği azalmış doyumluk, glikolizasyonu artan proteinler ve olası tip 2 diyabet aşırı fruktoz tüketimi ile ilişkili bulunmuştur. Ancak yayınlanan bilimsel makalelerin deney tasarımlarında çok fazla çeşitlilik mevcuttur. Bazı çalışmalarda saf fruktoz kullanılır iken bazı çalışmalarda fruktoz glikoz karışımı kullanılmıştır. Özellikle saf fruktoz kullanılan hayvan tabanlı çalışmalarda çok olumsuz metabolik etkiler saptanmıştır (Elliot ve ark. 2004; Faeh ve ark. 2005; Gross ve ark. 2004; Sheludiakova ve ark. 2012).

YFMŞ'nin sukroza oranla avantajlarından biri ucuz olmasıdır. Fruktoz içeriği yüksek olan YFMŞ-90 sukrozdaki daha tatlıdır. Farklı tat derecesine sahip olan YFMŞ-42 ve YFMŞ-55 çeşitli yiyeceklerin tadlarına göre kullanılabilir. YFMŞ daha iyi çözünürliğe sahiptir. Stabilitesi daha yüksektir. Şurup olarak uzun süre kristalize olmadan saklanabilir. YFMŞ sıvı formda olduğundan taşınması ve özellikle sıvı içeceklerde kullanılması daha kolaydır. YFMŞ asidik karakterli olduğu için koruyucu etkiye sahiptir, kullanıldığında diğer koruyucuların fazla kullanılması gerekmemektedir. YFMŞ, doğal tat vererek tatlandırma özelliğine sahip olduğu için aromalı gıdalarda yaygın bir şekilde kullanılabilir. YFMŞ ürünlerin lezzet ve tüketim kalitesini artırmaktadır (Sheludiakova ve ark. 2012).

Dezavantajları içerisinde absorpsiyon sonrası pankreastan daha az insülin salgılanmasına neden olduğundan doyma hissini etkilemektedir. Aşırı fruktoz tüketilmesi durumunda, fazla fruktoz hızlı bir şekilde trigliseride çevrilmekte ve esas olarak yağ dokusunda depolanmaktadır. Genetiği değiştirilmiş mısırdan üretilen YFMSŞ'u, genetiği değiştirilmiş ürünlerden duyulan endişeleri YFMSŞ kullanılan ürünlere de taşımaktadır. YFMSŞ'u gıdaların lezzet ve tüketim kalitesini artırmakla birlikte aşırı gıda tüketimine de neden olmaktadır. Başlıca obezite olmak üzere, insülin direnci, hipertrigliseridemi, metabolik sendrom, non alkolik yağlı karaciğer hastalığı gibi birçok sağlık sorununa yol açtığı ileri sürülmektedir (Parker ve ark. 2010; Karaoğlu 2011).

4.3 Obezite ve Metabolik Sendrom

Obezitenin hastalık olarak sınıflanmasının üzerinden henüz 50 yıl geçmişken günümüzde bir epidemi haline gelmiştir. Özellikle çocuk ve adolesanlarda hızla artması yeni çevresel faktörlerin soruna dahil olabileceğini düşündürmüştür. Epidemi halini almasındaki çevresel ana etmen fazla kalori alımı ve hareketsizlik olarak gösterilmektedir. Fruktoz eklenen gıdalar son zamanlarda fazla kalori alınımını etkileyen faktörlerden biri olmuştur. Bununla birlikte fruktoz içeriği yüksek işlenmiş gıdaların aşırı tüketilmesi patojenik sonuçlara yol açabildiğinden bu konuda araştırmalar yapılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar fruktozdan zengin gıdaların ve şeker tüketiminin artışı ile obezite insidansının artışı arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (George ve ark. 2004; Shapiro ve ark. 2008). Yüksek fruktozlu diyetle beslenen sıçanlarda yapılan pek çok çalışmada metabolik sendrom, hipertrigliseridemi, bozulmuş glikoz toleransı, insülin direnci, hiperürisemi, endotelyal disfonksiyon, hipertansiyon ve vücut ağırlığında artış saptanmıştır. Aynı miktarda glikozla beslenen sıçanlarda aynı durum gözlenmemiştir. Bununla ilgili bir takım mekanizmalar ortaya konulmuştur. Akut fruktoz tüketimi insülin ve leptin salınımını uyarmamakta, postprandial ghrelin supresyonu da yapmamaktadır. Uzun dönemde ise yüksek fruktozlu gıdalarla beslenmek kalori alımını artırarak kilo alımı ve obeziteye neden olmaktadır. Sıçan ve insan çalışmalarında kronik fruktoz tüketiminin leptin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Elliot ve ark. 2004; Al-Rasheed ve ark. 2014). Bu durumun leptin direncinin bir göstergesi olduğunu ve obezitenin altında yatan ana mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir. Özellikle fruktoz eklenen

İçeceklerin katı fruktoza göre daha çok kilo alımını etkilediği düşünülmektedir. Bu neden ile sade fruktoz içeren %50 den fazla oranda fruktoz içeren YFMS gibi tatlandırıcıların eklendiği içeceklerin bu artışa sebep olduğu düşünülmektedir. 1970'lerde artan YFMS içeren içeceklerin tüketimi obezitedeki hızlı artış ile ilişkili olabilmektedir (Havel 2005).

“Metabolik sendrom” termi 1920'lere kadar uzanmaktadır ve 1970'lerin sonunda genel olarak kullanılmaya başlamıştır. Metabolik sendrom vücudun enerji kullanımı ve depolamasında oluşan bir bozukluktur. İnsulin rezistansı, abdominal obezite, dislipidemi, endotelial disfonksiyon, genetik yatkınlık, hipertansiyon, hiperkoagulat durumu ve kronik stres gibi durumlar metabolik sendromu oluşturan faktörlerdendir. Türkiye Endokrinoloji Metabolizma Derneği, Metabolik Sendrom Çalışma Grubunun önerdiği, Metabolik Sendrom Tanı Kriterlerine (2005) göre diyabetes mellitus veya bozulmuş glikoz toleransı veya İnsülin direnci parametrelerinden en az biri; Hipertansiyon (sistolik kan basıncı >130 mmHg, diyastolik kan basıncı >85 mmHg veya antihipertansif kullanıyor olmak), Dislipidemi (trigliserid düzeyi > 150 mg/dl veya yüksek yoğunluk lipoprotein (HDL) düzeyi erkekte < 40 mg/dl, kadında < 50 mg/dl), Abdominal obezite (Vücut Kitle İndeksi > 30 kg/m² veya bel çevresi: erkeklerde > 94 cm, kadınlarda > 80 cm) bulunması olarak tanımlanmaktadır (Arslan ve ark. 2009).

Metabolik sendromun kardiyovasküler hastalık ve diyabet gelişme riskini artırdığı bilinmektedir (Kaur 2014). Metabolik sendromu olanlarda tip II diyabet gelişme olasılığı olmayanlara göre 5 kat fazla olarak saptanmıştır (Grundy 2008). Dünya çapında yaş ve yer farklılıklarına göre %10-%84 arasında değişen popülasyonda metabolik sendrom bulunmaktadır. Son zamanlarda modern yaşam değişikliklerinden dolayı metabolik sendroma yakalanan kişilerin sayısı artmaktadır. Bu artışa neden olan ana faktörler gelişmiş toplum bireylerinin hareketsiz yaşamları, beslenme şekillerinde değişiklikler ve çevresel unsurların yanında genetik faktörler etkili olmaktadır (Aydın A 2009).

Tatlandırıcı eklenen içeceklerin aşırı tüketilmesi obeziteye bağlı olan intrahepatik yağ birikimi ve metabolik sendrom gibi bozukluklara neden olmaktadır. Fruktozun YFMS'unda olduğu gibi “serbest” monosakkarit halinin disakkarit sukrozdaki “bağımlı” haline göre kilo artışı ve metabolik bozukluklara yol açma

olasılığının daha fazla olduğu düşünülmektedir. Sheludiakova ve arkadaşları (2012) yaptığı bir çalışmada 56 gün boyunca yüksek fruktoz ve sukroz içeren içeceklere ve yiyeceklere maruz kalan sıçanların metabolik indeksleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonu sıçanların abdominal yağ oranında artış, yüksek trigliserid düzeyi ve insulin/glikoz homeostazında bozukluk saptanmıştır. Diğer bir çalışmada da %10 fruktoz eklenen içecek ile beslenen sıçanlarda 8.hafta sonu vücut ağırlıkları, LDL seviyesi, açlık kan şekeri, trigliserid seviyesi ve kolesterol seviyesinde artış gözlenirken HDL ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyelerinde düşüş olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla fruktoz içeren içeceklere maruziyet, deneysel hayvan modellerinde diyabetis mellitus riskini artırmaktadır. Hayvanların açlık kan şekeri ortalama 130mg/dl düzeye ulaşmıştır (Al-Rasheed ve ark. 2014).

4.4 Fruktoz ve insülin direnci

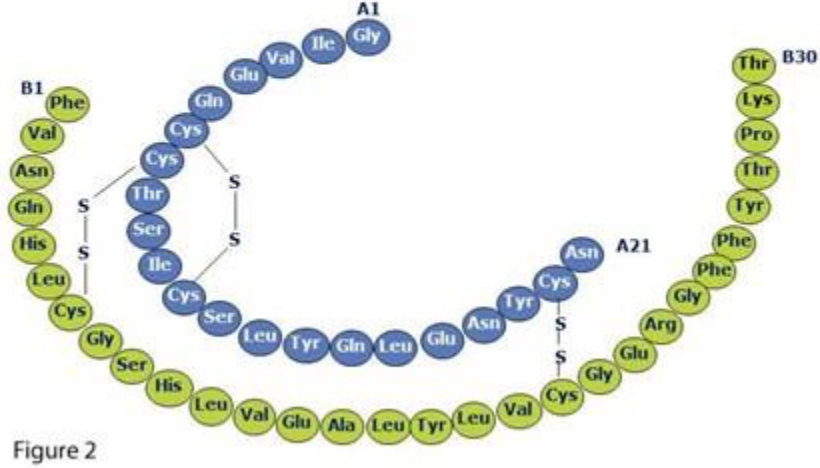
Fruktozun insülin aracılığı ile diğer organlarda oluşan patolojik hasara yol açtığı düşünüldüğünden fruktoz ve insülin direnci ilişkisi önem kazanmaktadır. İnsülin pankreastaki langerhans adacıklarının beta-hücreleri tarafından üretilen ve salgılanan, moleküler ağırlığı 5,8 kDa olan, 21 amino asitlik A zinciri ile 30 amino asitlik B zincirinden oluşmuş bir polipeptit hormondur (**Şekil 4.4.1**). İnsülin karaciğerde glikoz üretimini baskılayarak, kas ve yağ dokusunda glikoz alımını stimule ederek insan ve hayvanlarda kan glikoz seviyesinin homeostazisi sağlamaktadır. İnsülin aynı zamanda birçok önemli anabolik işlevleri düzenlemekte örneğin kas ve karaciğerde protein ve glikojen sentezinin kolaylaştırılması, karaciğer ve yağ dokusunda lipid sentezinin ve depolanmasının artırılması, insüline cevap oluşturabilen dokularda yağ asidi oksidasyonunun, glikojenolizinin ve glikoneojenezin inhibisyonu gibi. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda insülin sinyal yolağındaki önemli bileşenlerin farmakolojik veya genetik manipülasyonları sonucu insülin direnci, metabolik disfonksiyon ve kardiyovasküler hastalıklar ortaya çıktığı gösterilmiştir (Havel 2005; Zhang ve Liu 2014).

Vücuttaki hücrelerin çoğunluğu insülin aracılığı ile glikoz kullanarak enerji ihtiyacını karşılarlar. Yeterince enerji olduğunda insülin sinyali ile glikoz karaciğer ve yağ dokusunda depolanır. İnsülin direnci, insülinin glikoz kullanımını stimule etmesindeki defekt olarak tanımlanır. İnsülinin etkisinin azalması kanda glikozun

artması ve dolayısıyla kan glikoz homeostazisinin korunması için pankreasın insülin salınımı için uyarılması ile sonuçlanır. Böylece hiperglisemi ve hiperinsülinemi oluşur. Dokularda insülin direnci gelişmesi hepatik steatosis, endotelial disfonksiyon ve kardiyovasküler bozukluklara yol açabilmektedir (Shawky ve ark. 2014).

Klinikte İnsülin direncinin belirlenmesi için birçok testlerin bir arada değerlendirilmesi gerekmektedir. Genel olarak kan glikoz seviyesinde artış, trigliserid ve LDL kolesterol seviyesinde artış ve HDL kolesterol seviyesinde azalma insülin direncini işaret etmektedir. Laboratuvar testleri olarak: Oral glikoz tolerans testi (OGTT), Hemoglobulin A1c (HbA1c) testi, Lipid profil testi ve Homeostatik model değerlendirme testi (HOMA testi) yapılmaktadır. HbA1c testi 3 ay içindeki kan glikoz ortalamasını gösterebilmektedir. Lipid profil testinde trigliserid, HDL, LDL ve kolesterol seviyeleri ölçülmektedir. Trigliserid çok yüksek düzeyde ise direkt LDL (DLDL) ölçülmektedir. HOMA testinde beta hücrelerin insülin üretme ve insüline duyarlılığı ölçülmektedir (Lowndes ve ark. 2014).

Diğer ek testler açlık insülin seviye testi, Yüksek-sensitivite C-reaktif Protein (hs-CPR) testi, LDL partikül testi, Kantitatif İnsülin Sensitivitesi Kontrol İndeksi (QUICKI) ve İnsülin Tolerans Testini (ITT) içermektedir. hs-CPR testi kardiyolojik riskleri ortaya koyabilmektedir. LDL partikül testinde çeşitli LDL partikülleri tespit edilebilir. ITT insülin sensitivitesinin belirlenmesinde kullanılır ve genel olarak obez ve polikistik over sendrom (PCOS) olanlarda tercih edilir (Lab test online. <https://labtestsonline.org/understanding/conditions/insulin-resistance/start/1>).

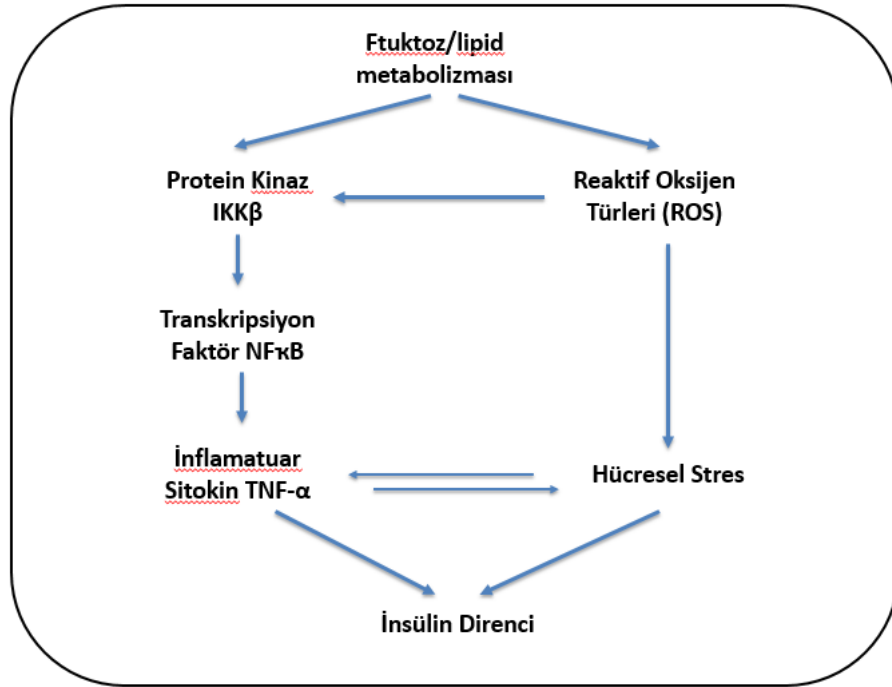


Şekil 4.4.1. İnsan insülin hormon yapısı. Mavi boyanan A zinciri ve yeşil boyanan B zinciri (Meyts 2012).

Deneyisel modellerde saf fruktoz verilerek veya YFMŞ içme suyuna karıştırılarak insülin direnci oluşturulmaktadır (Gözükaya 2013; Al-Rasheed ve ark. 2014). Hayvanlarda fruktoz lipojenезisi stimüle etmekte ve hepatik ve ekstrahepatik insülin direncine, dislipidemi'ye ve hipertansiyon'a yol açmaktadır. İnsülin direncinin ektopik lipid birikmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda kısa-sürelі aşırı fruktoz tüketilmesi de-novo lipojenезisi ve kan trigliserid düzeyini artırmakta ve hepatik insülin direnci oluşturmaktadır. Fruktoz tarafından indüklenen insülin direncinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanmamakla birlikte yüksek-yağ ile indüklenen insülin direnci ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Yüksek-fruktoz ve yüksek-yağlı gıdalar kas hücrelerindeki insülin sinyal yolağının aynı basamaklarına müdahale etmektedir ve her iki örnekte tiazolidinedion ile tedavi edildiğinde insülin sensitivitesi artmıştır (Le ve Tappy 2006; Shawky ve ark. 2014; Babacanoglu ve ark. 2013).

Fruktozun insülin direncini oluşturma mekanizmaları araştırılmış çalışmalarda fruktozun hücrel stes cevabını aktive ettiği ortaya konulmuştur (Şekil 4.4.2). Bu

çalışmaların birinde hücrel stres yolağı ile ilişkili olan c-jun NH(2)-terminal kinaz (JNK) aktivitesinin arttığı ve bu hayvanların fruktoza cevap oluşturarak hepatik insülin direnci geliştirdiği bildirilmiştir. Bu hayvanların hepatositleri primer kültüre alındığında insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) fosforilasyonunun insüline karşı cevap oluşturmasının azaldığı gözlemlenmiştir. Fruktoz ile indüklenen JNK aktivitesi lipoksijenaz inhibitörü ile tedavi edilebilmiştir ve bu sonuç fruktozun metabolik etkisinin karaciğer hücrelerinde inflamatuvar yolağın aktifleşmesi ile ilişkili olduğunu gösterir. JNK aktivitesi hücrel stres cevabında anahtar rol oynayan faktörlerdendir ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinleri veya reaktif oksijen türlerini (ROS) tetikler. Sonuç olarak fruktozun insülin direncini oluşturma mekanizması lipidinki ile benzerlik gösterir ve hücrel strese yol açar (Wei ve Pagliassotti 2004).



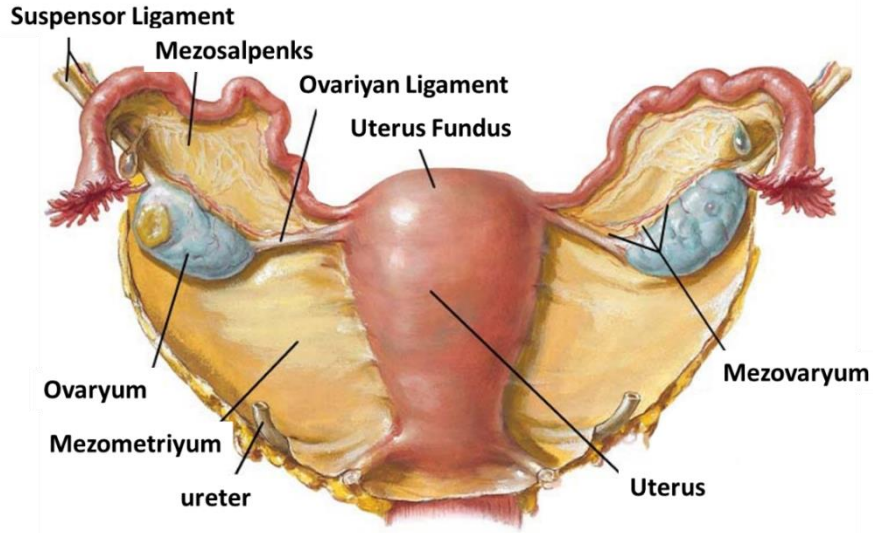
Şekil 4.4.2. Fruktozun insülin direnci oluşturma mekanizması. (Le ve Tappy 2006).

Fruktoz/glikoz 50/50 %10 oranında içme suyuna eklenen artı diyetle fruktoz eklenerek serbest fruktozun Wistar sıçanlarda oluşturduğu metabolik etkiler araştırıldığı bir çalışmada ellialtıncı gün boyunca beslenme sonucu vücut ağırlıkları ve kalori alımını, insülin duyarlılığı ve glikoz homeostazisi, yağ oranı, hepatik

trigliserid ve kan lipid düzeyleri değerlendirilmiştir. Deney sonunda şeker eklenen su ile beslenen hayvanların normal diyet ile beslenen kontrol gruba göre %20 oranda daha fazla kalori aldığı ancak kilo alımında farklılıkların olmadığı saptanmıştır. Fakat bu hayvanlarda abdominal yağ birikimi, yüksek hepatik trigliserid düzeyi ve bozulmuş glikoz/insülin homeostazisi gelişmiştir. Fruktoz/glikoz grubunda sukroz grubuna göre artmış açlık glisemi tespit edilmiştir (Sheludiakova ve ark. 2012).

4.5 Ovaryum

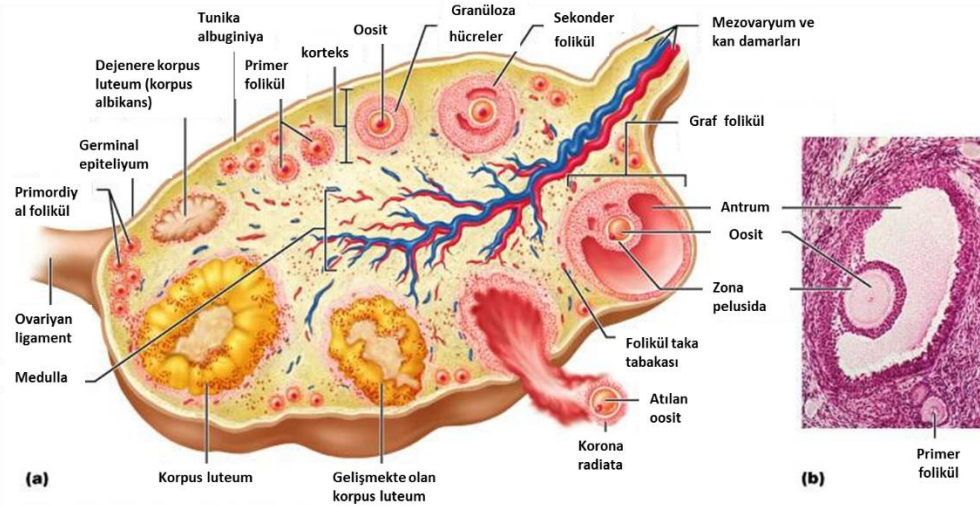
Kadın genital organları dış genital organlar ve iç genital organlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. İç genital organlar ovaryum, tuba uterina, uterus ve vajinadır. İnsanda ovaryum 3 cm uzunluğunda 1,5 cm genişliğinde 1 cm kalınlığında badem şeklinde pembemsi bir organdır. Ovaryum'lar pelviste sağda ve solda kendilerine ait ukurcuklara (fossa ovarica) yerleşiktirler. Tuba uterina'nın arka ve alt kısmında bulunan ovaryum'lar, ligamentum latum uteri içinde bulunurlar. Uzun ekseni hemen hemen vertikal yöndedir. Pembemsi renkli olan ovaryum'ların yüzü ergenlik çağına değin periton'la örtülü olup düz ve parlaktır. Puberteden sonra periton özelliğini yitirmesi ve matlaşması ile beraber ovulasyon ve doğurmaya bağlı olarak ovaryumların üzeri pürtüklü bir görünüm alır. Ovaryum ovaryan ligament ile uterusu, suspensor ligament ile pelvik duvarına tutunarak pelvik boşluğunda yer alır. Fimbrica ovarica adı verilen tuba uterinadin uzanan uzantı ile tuba uterinaya bağlanır (**şekil 4.5.1**). Ovaryumların damar ve sinirleri hilustan organa girip çıkarlar (Paulsen ve Waschke 2011).



Şekil 4.5.1. Ovaryumun anatomik yerleşimi (F. Netter 2013. <http://marielea.over-blog.com/>).

Ovaryum aorta abdominalis'in bir dalı olan arteria ovarica ve arteria uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus'un anastomuz yapması ile oluşan arter tarafından beslenir. Arter hilum ovarii'den organa girer ve medulla-korteks sınırında oluşturduğu pleksustan dağılan dallarıyla, foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağları oluşturur. Plexus ovaricus'tan çıkan venler birleşerek az bölümü plexus uterovaginalis'e, çoğu ise ligamentum ovari suspensonum içerisindeki vena ovarica'ya açılırlar. Vena ovarica, arteria ovarica'larla birlikte uzanırlar. Sol taraftaki vena renalis'e, sağ taraftaki ise vena cava inferior'a açılır (Paulsen ve Waschke 2011).

Histolojik olarak ovaryum dışta korteks içte medulla olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. Dıştan tek katlı kübik veya yassı olan ovaryum yüzey epiteli ile örtülüdür ve bu epitele germinal epitel adı verilir. Germinal epitelin altında tunika albuginea denilen bağ dokusu bir tabaka ile çevrelenmiştir. Medulla: merkeze yerleşmiştir, gevşek bağ dokusu, büyük kıvrıntılı kan damarları, lenfatik damarlar ve sinir dokusu içerir. Korteks: perifere yerleşmiştir ve hücrelerden zengin bağ dokusu içinde gelişmekte olan ovaryan foliküller içerir. Folikül etrafında düz kas lifleri bulunur (Ross ve Pawlina 2011).



Şekil 4.5.2. Ovaryumun histolojik özelliği (Benjamin 2004). (a) ovaryum korteks ve medullanın yapısı. Ovulasyon ve sonrası gelişen korpus luteum ve korpus albicans. (b) ovaryumun hemotoksilen-eozin boyamasında Graaf folikül ve primer folikül.

Germinal epitelyum tek katlı kübik veya yassı epiteldeldeden oluşmuştur. Tunika albuginya bağ doku yapısındadır. Primordiyal foliküllerde oosit ve foliküler hücreler birbiri ile yakın temestadır. Oosit 30 µm büyüklüğünde, belirgin çekirdeği ve çekirdekçik bulunur. Primer folikülde oosit 50-80 µm büyüklüğündedir. Oosit etrafında zona pelusida tabakası bulunur ve foliküler hücreler tek veya çok katlı kübiğe dönüşerek granuloza hücreleri oluşturmuştur. Granuloza tabakasını stromal hücreler çevrelerler ve teka tabakası adı verilir. Sekonder folikülde granuloza hücreleri 6-12 kata ulaşmıştır ve granuloza hücreleri arasında antrum adı verilen boşluklar bulunur. Oosit 125 µm büyüklüğündedir. Graaf folikülde antrum çok belirgindir folikül büyüklüğü 10mm'ye ulaşmıştır. Graaf folikülden oosit atılır ve korpus luteum adını alır. Korpus luteum dejenerasyona urarak korpus albicans gelişir (Ross ve Pawlina 2011).

Ovaryumun iki esas fonksiyonu vardır: gamet üretmek ve steroid hormon üretmek. Menstuel siklus ile eş zamanlı olarak ovaryumda da ovaryan siklusu gerçekleşir. Ovaryan siklusu ovaryumdaki foliküllerin gelişip olgunlaşma sürecidir ve üç evreden oluşur: foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Foliküler evrede primordiyal folikülden graaf folikül gelişir ardından graaf folikül ovulasyon ile bir oosit atar ve ovulatuvar evre gerçekleşir. Ovulasyon sonrası gerçekleşen değişimler luteal evre olarak tanımlanır. Ovulasyon gerçekleştikten sonra luteanizasyon olayı ile folikül teka interna ve granuloza hücreleri teka luteal ve granuloza luteal hücrelerine

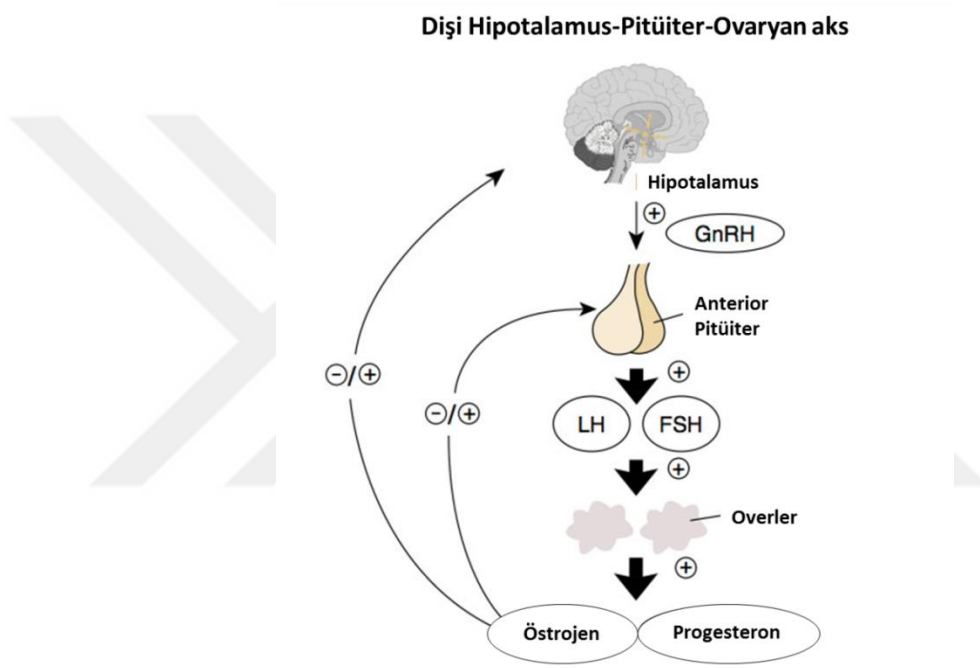
farklılanırlar. Bu hücrelerin içinde lipid damlacıkları oluşur ve hücreler hacim olarak büyür. Folikül içi bağ dokusu ile doldurulur ve sonuç olarak korpus luteum oluşur. Korpus luteumun sarı görünümü hücre elemanlarındaki lipid damlacıkları sebebindendir. Graaf folikül aşamasına ulaşamayan foliküller granüloza hücrelerin apoptozisi sonucu atreziye urar (Ross ve Pawlina 2011).

Folikül gelişimi ovulasyon için seçilen folikül ile koordineli olarak rol oynayan çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Folikül gelişimi yani folikülogenez, oosit gelişimi ve gerekli steroid hormonların sağlanmasında rol oynadığından, normal fertilité ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi için gereklidir. Ovulasyon ile dişi gamet hücresi olan oosit fertilizasyonun gerçekleşmesi için tuba uterinaya atılır. Ovulasyonun gerçekleşmesi İçin gereken faktörler: Folikül sıvı hacimin ve basıncın artması, Plazminojen tarafından folikül duvarında enzimatik proteolizisin aktivasyonu, Oosit-kumulus kompleksi ve stratum granülozum glikozaminoglikanların hormonal pozisyon değişikliği, Prostaglandin tarafından taka eksterna tabakası düz kaslar kasılmasıdır (Ross ve Pawlina 2011).

Korpus luteum görevi: Progesteron ve östrojen üreterek uterusun büyümesi ve sekresyon aktivitesini tetiklemek, hCG salgılamak, fertilizasyon gerçekleşirse gebeliğin 6.ayına kadar işlev görür, Gebelik gerçekleşmezse korpus luteum dejener olarak korpus albikansa dönüşür, Korpus albikans: Ovulasyondan 10-12 gün sonra Korpus luteumun dejenerasyonu hCG azlığına bağlı olarak progesteron ve östrojen üretiminin azalması sonucu ortaya çıkar. Korpus albikans dejenere olan luteal hücreleri arasında hiyalin materyallerin toplanması sonucu ortaya çıkmıştır. Korteksin derinlerinde yerleşir ve birkaç ay içinde tamamen ortadan kayıp olur (Çelik 2012).

Overde üretilen steroid hormonlar östrojen ve progesterondur. Over fonksiyonu hipotalamus-hipofiz-ovaryan sistem tarafından düzenlenir (Şekil 4.5.3). Hipotalamus dış etkenlere cevap olarak gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) salgılar ve hipofize yönlendirir. GnRH etkisi ile hipofizden lutenizasyon hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salgılanır. LH ve FSH gonadotropin hormonları denir ve dişilerde overi uyarak üreme işlevinin ve steroid yapılı cinsiyet hormonlarının sentezinin kontrol edilmesini sağlar. Östrojen ve progesteron üreme organlarının gelişimini ve olgunlaşmasını, ikinci cinsiyet karakterlerinin gelişimini ve sürdürülmesini, menstruel siklusu kontrol etmektedir, aynı zamanda gebeliğin

gerçekleşmesi ve sürdürülmesi, laktasyonun düzenlenmesi gibi olaylarda da rol oynamaktadır. Bu hormonlar değişik dokular üzerinde güçlü anabolik etkiler meydana getirebilmektedir. Özellikle cilt, kemik, kas ve kan dokularında anabolik reaksiyonları uyararak bu dokuların gelişmesini sağlamaktadır. Dişilerde adrenal bez sentezlediği androjenlerin (testosteron, androstenodion) önemli bir kısmının perifer dokularda östrojenlere dönüştürülmesinden dolayı önemli östrojen kaynağı olarak görev yapmaktadır (Çelik 2012).



Şekil 4.5.3. Dişi Hipotalamus-Pitüiter-Ovaryan aks. Hipotalamustan salgılanan GnRH, hipofizden FSH ve LH salgılanmasını artırır. FSH granüloza hücrelerine etki yaparak, LH teka interna ve luteal hücrelerine etki yaparak östrojen ve progesteron üretimini tetikler. Östrojen ve progesteron da hipotalamusa negatif feedback yaparak GnRH salınımını kontrol eder (UNSW Embryology 2012. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:HPG_female_axis.jpg).

4.6 Kadın İnfertilitesi

İnfertilite genel anlamda sağlıklı popülasyona göre daha az gebe kalabilme kabiliyeti olarak tanımlanırken özgün anlamda bir çiftin korunmasız 1 yıl düzenli

cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememeleri şeklinde tarif edilir. Çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertilite tanısı almaktadır. Normal fertil çiftlerde aylık konsepsiyon oranı %20'dir. İnfertilitenin en sık nedenleri tubal-peritoneal patoloji (%30-40), anovulasyon (%15) ve erkek faktördür (%30-40) ve geri kalan bölümünü açıklanmamış infertilite grubu oluşturmaktadır. Normal semen analizi, ovulasyon varlığı, normal uterin kavite ve bilateral tubal açıklık varlığında açıklanmayan infertilite tanısı konur (44). %81 infertil kadınlarda genel olarak tanımlanan infertilite nedenleri : ovulasyon bozukluğu (%25), endometriosis (%15), pelvik adhezyon (%11), tubal tıkanıklık (%11), diğer tubal abnormaliler (%11) ve hiperprolaktinemi'dir (%7). İnfertilite için gerçekleştirilecek ilk tanısal testler: ovülasyon dokümantasyonu, tubaların açıklığı ile uterus kavitesinin değerlendirilmesi ve semen analizidir (David ve ark. 2011).

Endokrin açıdan hipotalamus, hipofiz, tiroid, adrenal bez ve ovaryum kaynaklı kadın infertilitesi söz konusudur. Amenore ve ovulasyon yetmezliğine bağlı olarak GnRH salgılanma biçimindeki bir değişiklik sonucu hipotalamik amenore ortaya çıkar. Aşırı ekzersiz, besin yetmezliği ve psikolojik sorunlar fonksiyonel hipotalamik amenoreyi meydana getirir. İnfiltratif bozukluklar ve tümörler gibi hipotalamik lezyonlar da azalmış GnRH salgılanması ve amenoreye neden olabilir (Gordon 2010).

Fonksiyonel pitüiter adenomlar örneğin prolaktinom, akromegali ve cushing hastalığı pitüiter kaynaklı kadın infertiliteyi oluşturabilmektedir. Prolaktinom hastalarında genel olarak abnormel mestruel siklus, galaktore görülür ve ortalama %10 oranda infertilite saptanabilir olabilir (Gordon 2010). Akromegali kadınların %50'den fazlasında zayıflamış fertilitate ve mestruel disfonksiyon görülmektedir. Bunun nedenleri çeşitli olmakla birlikte gonadotropin baskılanması ve yıkımı sonucu ortaya çıkan hipopitüitarizm ve gonadotropin rezervinin azalması ve hipotalamus-hipofiz-over aks disfonksiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır (Katznelson L ve ark. 2001). Cushing hastası olan kadınlarda mestruel düzensizlik ve fertilitate problemleri sıklıkla ortaya çıkmaktadır. Adrenokortikotropik hormon (ACTH) bağımlı Cushing hastalığı olan 45 kadın ile yapılan bir çalışmada kadınların %80 oranında menstrüel düzensizlik saptanmıştır ve 14'ünde oligomenore, 15'inde amenore ve 4'ünde polimenore gözlemlenmiştir (Lado-Abeal ve ark. 1998).

Hipertiroidizm hastalarında kan östrodiol seviyesi yükselir buna bağlı olarak menstruel abnormalite ve primer veya sekonder infertilite problemleri ortaya çıkmaktadır. Hipotriodizm olan kadınlarda da serum östrodiol seviyesinin azalmasına bağlı olarak menstruel siklus bozuklukları ortaya çıkmaktadır ve hipotriodizm şiddetine göre bozukluk derecesi de artmaktadır (Krassas ve ark. 2010).

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH) ve Addison hastalığı gibi adrenal bez bozuklukları da kadın infertilitesine neden olmaktadır. KAH olan kadınlar genital anomaliler, homoseksüel olma olasılığın yüksek olması, PCOS ve hiperandronejizim gibi nedenlerden dolayı doğum için standardize insidans oranı ortalama 0,21 olmaktadır (Nermoen ve ark. 2010). Addison hastalığı olan kadınların fertilitate problemleri ile ilgili net bir bilgi olmasa da %7'sinin prematür over yetmezliği (POF) olduğu bildirilmiştir (Erichsen ve ark. 2009). POF 40 yaş altındaki kadınlarda ovaryan fonksiyonun kaybı olarak tanımlanır ve 40 yaş kadınları 1:100 oranda, 35 yaş kadınları 1:250 oranda etkilemektedir. PCOS ve POF over kaynaklı kadın infertilitesinin esas nedenlerindedir. PCOS olan kadınlarda oligo- veya anovulasyon, kliniksel veya kimyasal hiperandrojenizm ve ultrason veya direkt muayenede polikistik over gibi problemler görülmektedir. PCOS hastalarının %40'ında fertilitate problemleri ortaya çıkmaktadır. POF hastaları genel olarak over veya oosit virtifikasyonu veya oosit bağıışı ile gebe kalabilmektedir (Gordon 2010).

Tatlandırıcı eklenen gıda tüketiminin ve fertilitate problemlerinin eş zamanlı olarak artması, araştırmacıları bu ikisi arasında bir korilasyonun olduğunu düşündürmektedir. Chaffin ve arkadaşları (2014) rhesus macaque'lar üzerinde yaptığı bir çalışmada, yetişkin dişi maymunlar 6 ay boyunca batı diyet desenine uygun diyet ile beslenmiştir ve sonra ovulasyon indüklenerek maymunların oositlerini toplamıştır. Toplanan oositlerin morfolojik testleri yapılarak in vitro fertilizasyonu sağlanmıştır. Granüloza hücreleri, komulus hücreleri ve MII oosit mikroarray analizi yapılmıştır. İlgi çeken bir sonuç olarak yüksek-şeker içeren yiyecek ile beslenen maymunlarda olgun oosit oranı %18,5 olarak kontrol grubundaki %86 orana göre çok düşük olarak saptanmıştır (Chaffin ve ark. 2014). Yüksek şekerli diyetlerin glikoz tolereansını etkileyerek oosit maturasyonunu etkilediği düşünülmektedir. Tip II diyabet oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada farelerden toplanan oositler IVM için inkübe edildiğinde yüksek glikoz ortamına

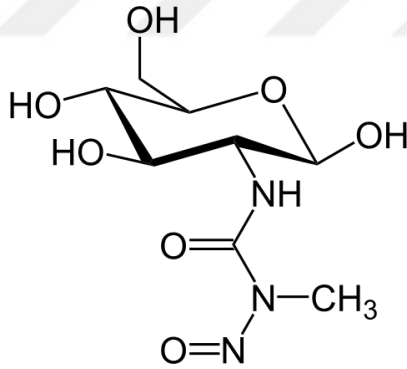
alınan, diyabetik farelerden alınan, oositler kontrol gruba göre daha yüksek maturasyon oranı göstermiştir (Yaakov 2014).

Fruktoz içeren içecek ile beslenen sıçanlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada dişi sıçanlar çiftleştirilerek maternal fruktoz tüketiminin fetusa olan etkisi araştırılmıştır. Dişi sıçanlar 28 gün boyunca ve gebelik döneminde normal diyet ve %10 fruktoz içeren içme suyu ile beslenmiştir ve beslenmenin 14.günü ve gastasyonel dönemin yirminci günü kan örnekleri alınarak kan şekeri, trigliserid, esterleştirilmemiş yağ asidi, kolesterol ve insülin düzeyleri test edilmiştir. Fruktoz ile beslenen gebe olmayan gruptaki sıçanların ağırlıkları deney sonrası azalmıştır ancak kan şekeri, kolesterol ve trigliserid düzeyleri kontrole göre artmış bulunmuştur. Gebe kalan sıçanlarda fetus ağırlıkları kontrol gruba göre daha düşük saptanmıştır. Tuzlu ve fruktoz içeren diyet ile beslenen sıçanlar diğer gruplara göre daha zor gebe kalmıştır (Gray ve ark. 2013).

Newell-Fugate ve arkadaşları (2014) ossabaw domuzları üzerinde yaptığı bir çalışmada yüksek-fruktoz, yüksek-kolesterol, yüksek-yag ve aşırı kalori diyet tüketiminin metabolik parametreler ve fertilité üzerine etkisini araştırmıştır. Dişi domuzlar 13 ay boyunca özel diyet ile beslenmiştir ve son 4 ayında overlerin ultrasonu yapılmıştır, kan örnekleri alınmıştır ve ağırlıkları ölçülmüştür. Sonra domuzlar ovulasyon indüksiyonu yapılarak siklus süresi ve androstenedion, total testosteron, progesteron, östradiol, FSH, LH, insülin, fruktozamin, lipid ve glikoz düzeyleri ölçülmüştür. Kontrol gruba göre özel diyet ile beslenen domuzlar hiperglisemik ve hiperinsülinemik bulunmuştur ve total kolesterol, trigliserid ve leptin düzeylerinde artış ve abdominal yağ birikimi saptanmıştır. Özel diyet ile beslenen gruptaki hayvanlarda daha uzun österus siklusu, daha yüksek serum androstenedion ve daha yüksek luteal faz serum LH düzeyi saptanmıştır. Kontrol grup hayvanlarda luteal fazda daha küçük ovaryan folikül gözlenir iken deney grubunda orta boy, ovulatuar ve kistik ovaryan foliküller gözlemlenmiştir. Bu besinler hayvanlarda obeziteye, metabolik sendroma ve abnormal üreme fonksiyonun gelişmesine neden olmuştur (Newell-Fugate ve ark. 2014).

4.7 Streptozotosin

Streptozotosin (STZ) katı halde iken stabil değildir ve dondurulmuş olarak saklanır. Kimyasal formulası $C_8H_{15}N_3O_7$ (Şekil 4.7.1) olup yapısındaki glikoz molekülünün konumuna göre α ve β izomerlerin karışımı şeklindedir. pH 4-4.5 olan asidik ortamda stabilitesi en iyi korunabilir. Deneysel çalışmalarda tip I diyabetin oluşturulması için kullanılır. STZ pankreas β hücrelerine direkt toksik etki yapar. Yapısında bulunan bir glikoz molekülü sayesinde plazma membranındaki glikoz taşıyıcı proteine bağlanarak hücre içine girer ve toksisite gösterir. STZ sadece GLUT2 tarafından hücre içine taşınır. STZ beta hücrelerin glikoz ile uyarılan insülin salgılamasını bloke eder (Vardı ve ark. 2003). STZ esas olarak nükleer DNA'ya etki yapar. Hücre içinde STZ dekompozisyona uğrar, bu sırada oldukça reaktif karbon iyonları oluşur ve bu iyonlar DNA bazlarının alkilasyonuna neden olduğu için ardından DNA tamir mekanizması başlar. Bu sırada poli ADP_{riboz} sentetaz aktivitesi artar dolayısıyla NAD^+ tüketimi artar, hücredeki NAD^+ depoları boşalır, NAD^+ tükenmesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir (Coşkun ve ark. 2005).



Şekil 4.7.1. STZ kimyasal yapısı (Wikipedia).

STZ, ilk kez 1960 yılında *Streptomyces achromogenes* adlı bir mantardan elde edilmiştir. Antibiyotik olarak kullanım sırasında diyabetojenik özelliği ortaya çıkmıştır. STZ'nin insülin salgılayan hücrelere olan toksik etkisi nedeniyle araştırmalarda diyabet modelleri oluşturmak amacıyla kullanılmaya başlamıştır (Coşkun ve ark. 2005).

Deneysel sıçan modellerinde tek doz STZ (50-80 mg/kg) intraperitoneal veya intravenöz yolla uygulanarak 3 gün gibi kısa bir sürede diyabet oluşturmak

mümkündür. Ancak vasküler bozuklukların görülebilmesi için 2-12 hafta beklenilmesi gerekmektedir (Değirmenci ve ark. 2005). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda STZ uygulamasından 3 gün sonra açlık kan şekeri ortalama 400mg/dl seviyesine ulaşabilmektedir (Dağdelen H 2011).

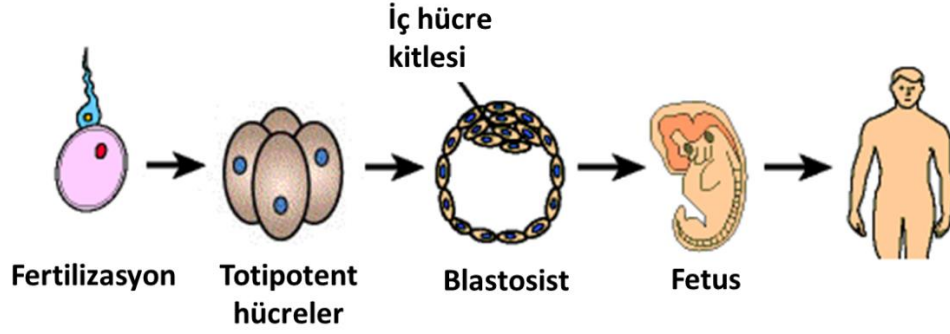
Koyunlarda yapılan bir çalışmada, over dokusu ototransplante edilen dişi koyunlara sistemik veya direkt ovaryan olarak glikoz, fruktoz ve galaktoz infüzyonu yapılmıştır ve infüzyon sonrası bu monosakkaridlerin oluşturduğu insülin cevabı ve over fonksiyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Sistemik fruktoz infüzyonundan sonra akut bir insülin cevabın oluşmadığı ancak dolaşımdaki FSH seviyesinin baskılandığı ($P<0,05$) ve infüzyonun bitiminden hemen sonra FSH ve insülin düzeyinde geçici bir artış ($P<0,05$) olduğu saptanmıştır. Ve bu geçici artışın ovaryan östrodiol ve androstenedion sekresyonunun artışı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Glikoz ve galaktozun sistemik infüzyonunun ovaryan steroidogenezisi etkilemediği saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada fruktozun koyunlarda ovaryan fonksiyonu etkilediği ve bunu indirekt olarak periferdeki insülin ve/veya gonadotropin seviyesini değiştirirerek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (Campbell ve ark. 2010).

4.8 Kök Hücre ve Hücresel Tedavi

KH kendilerini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Somatik hücrelerde, her hücre bölünmesinden sonra kromozomların üç kısmındaki telomer adı verilen DNA zincirinin boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. Telomerlerin kısalması hücre yaşlanması ile doğrudan ilişkilidir. Telomeraz telomerleri sentezleyen ve koruyan bir ters transkriptaz enzimidir. İnsan germ hücreleri, tümör hücreleri ve EmKH telomeraz etkinliğinin bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Buna dayanarak, sınırsız telomeraz etkinliği KH için bir belirteci olarak da kabul edilebilir (Karaöz ve Ovalı 2004).

KH özelleşmiş hücreler gibi işlev görmezler. Bir KH kalp kas hücresi gibi kan pompalamak için komşularıyla beraber çalışmaz, eritorsitler gibi oksijeni dokulara taşıyamaz veya sinir hücreleri gibi doku ve organlara gerekli olan elektrokimyasal sinyalleri iletmez. Fakat özelleşmemiş KH, kalp kası hücreleri, kan hücreleri veya

sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücelere kaynaklık edebilirler. KH birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler (Şekil 4.8.1). Buna en iyi örnek zigottur, zigot vücuttaki tüm hücre tipine dönüşebilme özelliğine sahiptir. KH farklılaşma potansiyelinin farklılığına göre totipotent, pluripotent ve multipotent diye adlandırılır. Totipotent bir KH yeni bireyi oluşturabilme potansiyeline sahiptir (Çelik 2012).



Şekil 4.8.1. Totipotent hücrenin yeni bireye kaynaklık etme potansiyeli (https://www.prismnet.com/~hcexres/power_tools/audience_task/define_needs.html)

KH için özelleşmemiş olarak kalmalarını sağlayan usuller ve şartlar, bilim insanlarının ilgisini çekmektedir ve laboratuvar ortamında KH'nin diğer hücelere dönüşmeden kültür ortamında yetiştirilmesi uzun yıllar çalışmalar gerektirmiştir. Fare EmKH izolasyonu ve üzerinde yapılan çalışmalar sonucu 1998 yılında ancak insan KH'sinin laboratuvar ortamında izolasyonu ve çoğaltılması gerçekleşmiştir. Normal ortamlarda KH organizmada farklılaşmadan kalmaktadır ve tamirat gereken durumlar ortaya çıktığında farklılaşmaktadır ve bu olayın gerçekleşmesi için gereken sinyaller günümüze kadar önemli bir araştırma konusu olmaktadır. 2003 yılında hematopoetik KH'nin farklılaşmadan kalması için Wnt sinyalinin önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (Reya ve ark. 2003). Aynı zamanda KH'i tanımlamak için KH yüzey belirteçleri belirlenmiştir. Örneğin Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'lerine özgün olarak CD105, CD73, CD90, STRO-1 gibi hücre yüzey antijenleri ve peptidler tanımlanmıştır (Ullah ve ark. 2015). Embriyonik KH Oct4, Nanog, Sox2 ve Foxd4 gibi transkripsiyon faktörleri ekspres etmektedir. Bunlara karşı antijenlerin kullanılması sonucu farklı KH tanımlamak mümkündür (Stewart ve ark. 2006).

KH farklılaşma özelliklerine ve elde edildikleri kaynaklara göre EmKH ve Erişkin Kök Hücre (ErKH) olmak üzere iki başlık altında incelenir. Yeni gündeme gelen KH kaynağı ise indüklenebilir pluripotent kök (İPS) hücrelerdir. EmKH olabilmek için gereken özellikler: immortalite ve telomeraz ekspresyonu; pluripotent özellik ve teratoma oluşumu; in vitro alt-kültürler süresince stabil karyotip; klonal özellik; Oct4 ve diğer pluripotent belirteç ekspresyonu; kimera oluşturabilmektir ancak etik problemlerden dolayı insan EmKH'lerinde kimera oluşturulmaz. EmKH yeni ilaçlar için gen hedeflerinin tanımlanması, gelişimsel biyolojide teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanması, gen tedavilerinde ve hücre esaslı tedavilerde kullanılmak üzere hücrelerin ve dokuların üretilmesinde kullanılabilir (Petersen ve Teroda 2001).

ErKH farklılaşmış dokular içerisinde yer alan hücrelerdir ve KH için temel özellikleri olan kendini yenileyebilme ve özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme özelliklerine sahip hücrelerdir. Ancak ErKH'nin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyelleri EmKH'den çok daha düşüktür ve genel olarak multipotent hücrelerdir. Bu tür hücreler her yaş grubundaki insanlarda bulunabilmektedir. Günümüzde beyin, kemik iliği, periferik kan, iskelet kası, epidermis, sindirim sistemi, diş pulpası, karaciğer, retina, kornea ve pankreas gibi dokularda erişkin KHin varlığı belirlenmiştir. ErKH etik problemlerin daha az olması ve teratom oluşturma yeteneğinin düşük olması açısından klinikte daha tercih edilmektedir. Buna en iyi örnek olarak hematolojide kullanılan kan veya kemik iliği nakli verilebilir. Kan ve kemik iliği naklinde dokudaki hematopoetik KH hasarın tamir edilmesi için harekete geçmektedir (Minguell ve ark. 2001).

Günümüzde en sık araştırılmakta olan ErKH tipi ise MKH'dir. MKH'ler bağ dokunun ana hücreleri olup ilk kez 1976 yılında Friedenstein ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Friedenstein çalışmasında kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. İlerleyen araştırmalar sonucu farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özellikler gösteren MKH'ler izole edilmiştir ve kültür ortamında çoğaltılmıştır (Çelik 2012).

MKH tanımlamasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; Plastik yüzeye yapışması (plastik adherens), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir. Plastik yüzeylere bağlanabilen insan ilik dokusundan alınan aspiratın %30'unu ilik stromal hücrelerin oluşturduğu düşünülmektedir (Prockop 1997). Erişkin MKH'ler in vitro ortamda gelişmekte ve uygun şartlar sağlandığında kemik, kırık, tendon, kas, yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir. Bu neden ile doku mühendisliği ve gen terapi uygulamalarında MKH'ler çekici hale gelmiştir (Elçin 2003). Bunların dışında MKH'lerin miyosit ve kardiyomyosite ve mezodermal olmayan hücrelerden hepatosit ve nöronlara da farklılaşabildikleri de bildirilmiştir (Petersen ve ark. 1999; Jiang ve ark. 2002; Schwartz ve ark. 2002).

MKH'ler hastalardan doğrudan elde edilebilir dolayısıyla bir immün reaksiyonun oluşturmaz. Organizmanın en zengin KH kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH'ler için ana kaynak sayılabilir. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotelial ve mezenkimal progenitor hücreler bulunmaktadır. Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Enzimatik yöntemler ile solid dokudan hücre izolasyonu yapılmaktadır. Kemik/periost, diş pulpası, karaciğer, kordon kanı, kordon stroması, yağ dokusu hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle MKH'lerin ayrıştırılması mümkündür (Ullah ve ark. 2015). Bu dokulardan KH elde etmede önemli olan MKH'ler ile fibroblastları ayırt etmektir. Kültür ortamında dokulardan elde edilen hücreler içinde fibroblastlar ilk olarak plastik yüzeye yapıştığı için ayrıştırmanın ilk saatlerinde yapışan hücreler değil sonra yapışan hücreleri MKH olarak kabul etmek daha saf KH eldesi için önemlidir. MKH'lerin farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özellikleri köken aldığı doku tipine göre bazı değişiklikler gösterebilmektedir. Bu neden ile spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen KHin kullanımının avantajlı olacağı gündeme gelmiştir (Alhadlaq ve Mao 2004).

MKH'ler kültür ortamında yüksek düzeyde sitokin, kemokin, matriks proteinleri ve büyüme faktörü sentezlerler; bunlar: KH faktörü (c-kit ligand), interlökin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-11, IL-15, Değişici Büyüme Faktörü (transforming growth factor, TGF- β), cofilin, galectin-1, laminin-reseptörü-1, cyclophilin A, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)'dir (Helena 2013; Alhadlaq ve Mao 2004). MKH'lerin çeşitli belirteçler eksprese etmektedir. Bunlardan CD105,

CD73, CD90 ve STRO-1 hücre yüzey antijenleri ve peptidlerdir; CD166, CD54, CD102, CD121ab, CD123, CD124, CD49 adhezyon molekülleri ve sitokin büyüme faktörü reseptörleridir (Ullah ve ark. 2015; Roche ve ark. 2006).

MKH'nin birçok alanda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur. Kemik dokularının tamiri, Osteoporoz, Kıkırdak dokusu tamiri, Dejeneratif nöron hastalıkları, Kardiyak rejenerasyon, Kemik iliği transplantasyonları, Konjenital genetik hastalıklar bu alanların başlıcalarıdır (Çelik 2012). Allojenik ve otolog hematopoietik KH nakillerinde MKH infüzyonunun nötrofil ve trombosit engrafmanını hızlandırdığı gösterilmiştir (Koç ve Lazarus 2001). Dünya genelinde reprodüktif tıp uygulamalarının yaklaşık %10-15'inde gamet hücresi yokluğu ve üretimi ile ilgili problemler ve üreme organlarındaki konjenital veya idiyoPATİK nedenlere bağlı oluşan eksiklik/hasar neticesinde uygulamalar yetersiz kalmakta veya tedaviden sonuç alınmamaktadır. KH, fonksiyonel hücre ve dokulara dönüşüm potansiyelleri sayesinde reprodüktif tıp uygulamaları için son derece önemli bir kaynak olabileceklerdir (Çelik 2012).

2003 yılında Hubner ve arkadaşları yeşil floresan protein yayan embriyonik KH'i kullanarak germ hücreleri elde etmiştir. Farklılaşan bu hücreler primordiyal germ hücre (PGC) belirteçleri c-kit, fare vasa homolog (MVH) protein ve Scp3'ü barındırmaktaydı. Üstelik çalışmanın devam eden kültürlerinde oosit benzeri yapılar, östrojen yapımı ve zona protein oluşmuş gözlemlenmiştir (Hubner 2003). 2004 yılında fetal domuz deri KH'leri kültür ortamında bazı germ hücre belirteçlerini eksprese eden hücrelere dönüştürülmüştür. 30-40 günlük kültür sonunda bu hücreler oosit benzeri yapılara dönüşmüş ve bir kısmı kumulus hücreleri ile kaplanmış ve gonadotropin uyarısı sonucu östrodiol ve progesteron yapımı izlenmiştir. KH tedavileri ovaryan rejenerasyonu ve oosit üretimi açısından kadın infertilitesi tedavilerinde gelecek vaad edicidir (Dyce ve ark. 2006).

4.9 Nitrik Oksit Sentetaz

1987 yılında Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) olarak bilinen maddenin Nitrik Oksit (NO) olduğu anlaşılmıştır (Palmer ve ark. 1987). NO üzerine yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda artmış ve organizmada birçok önemli rolünün keşfedilmesi nedeni ile 1992'de NO yılın

molekölü olarak tanımlanmıştır (Ribeiro ve ark. 1992). Bugün Endotel kaynaklı nitrik oksidin hem deneysel çalışmalarda hem insanlarda sürekli vasküler tonusun fizyolojik düzenleyici olduğu ortaya konulmuştur. Başta endotel hücreleri olmak üzere birçok hücrenin NO sentezlediği ve vasküler tonusun düzenlenmesinin yanı sıra bir mediatör olarak nörotransmisyon, immün direnç ve hücrel adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda birincil görevi olduğu bildirilmiştir (Moncada ve Higgs 2002).

NO, yarı ömrü 2-10 saniye olan renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir. Sentezlendikten kısa bir süre sonunda hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilerek nitrat ve nitrite dönüşür. NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol oynamaktadır. Yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu sentezlenmektedir (Siasos ve ark. 2013).

NOS izoenzimleri yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Yapısal NOS endotel ve nöronal NOS'u içermektedir ve devamlı bir şekilde var olan, vasküler tonus ayarlanmasında ve nörotransmisyonda rolü olan, küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan enzimlerdir. Esas olarak nöronlarda, vasküler endotel hücrelerinde, endokard, myokard ve trombositlerde bulunmaktadır. Endotel kaynaklı NOS, NOS-3 olarak da bilinir, arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağlı bir enzimdir ve eNOS aktivitesi asetilkolin, adenzin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir. Uyarılabilen NOS, NOS-2 olarak da bilinmektedir ve fonksiyonel olarak Ca^{+2} bağımsızdır (Thiemmerman 1994). Uyarılabilen NOS endotel hücreleri dışında özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Makrofajların, nötrofillerin, mast hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitokinlerle uyarılmasından sonra hücreler büyük miktarda NO sentezi yapabilmektedir. Makrofajlar dışındaki hücrelerde iNOS aktivitesinin rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak endotelde bulunan iNOS konjestif kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu durumlarda önemli olabilmektedir ve sitotoksik rol oynayarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitede önemlidir (Marletta ve Olken 1993; Tejero ve Stuehr 2013).

İnsan ve sıçanların overlerinde NOS proteini ve aktivitesi tespit edilmiştir (Van Voorhis ve ark. 1995; Van Voorhis ve ark. 2013). Enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak aşırı NO biyosentezi folikül stabilitesi ve fonksiyonunda bozulmaya neden olabilmektedir. Nitrik oksitle fertilizasyon yeteneği arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. NO sperm ile ovum arasındaki ilişkide de rol oynar (Agarwal ve ark. 2005).

Endotelyal NOS folikül gelişim sırasında teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oositin yüzeyinde eksprese olmaktadır. Patolojik durumlarda ki NO sentezinde indüklenebilir NOS önemli rol oynayabilmektedir (Lee ve ark. 2000). NO'in folikül gelişimi, granüloza hücrelerin gelişimi, ovulasyon ve lutenizasyona olan etkisinin Siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) aracılığı ile sekonder haberci olarak veya ROS oluşturarak gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir. Nöronlar, kan damarları ve immün sistem hücreleri üreme organların ayrılmaz parçalarıdır ve NO bu sistemlerde önemli fonksiyonlara sahip olduğundan üreme fizyolojisi ve biyolojisinin düzenlenmesinde ki önemli düzenleyicidir. Son immün efektör olarak iNOS tarafından üretilen NO, patojenleri ve abnormal hücreleri öldürme kapasitesine sahip olmak ile beraber, iNOS'un sürekli ekspresyonu normal doku hücrelerin zarar görmesine de neden olabilmektedir (Agarwal ve ark. 2005).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Deney Grubu

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen ağırlıkları $200\pm 10g$ arasında değişen erişkin 24 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Temin edilen hayvanların daha önce çiftleşmemiş ve herhangi bir deneysel çalışmada kullanılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Sıçanların laboratuvar koşullarına adaptasyonu amacıyla $22^{\circ}C$ ısıda 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu uygulanarak sıçan yemi serbest olarak (*ad libitum*) verilmiştir. Deneysel uygulamalar, deney hayvanlarının bulunduğu ortamdaki uzak ve sessiz bir çalışma ortamında yapılarak ve uygulamalar sırasında sert ve ani hareketlerden kaçınılarak stres yaratılmamaya çalışılmıştır. Araştırmamızda her bir grupta 4 dişi sıçan olacak şekilde 6 grup oluşturularak gruplara aşağıda belirtilen uygulamalar en az 8 hafta süre boyunca uygulanmıştır:

- 1.Grup:** Kontrol grubu (KG), özel diyet uygulanmayan grup, n=4
- 2.Grup:** YFMŞ grubu (YMŞF), YFMŞ suyu ile beslenen grup, n=4
- 3.Grup:** YFMŞ+YDKH grubu (YDKH + YFMŞ, YFMŞ+300 µl BY içinde/ 1.000.000, PPD enjektörü ile YDKH), n=4
- 4.Grup:** Sham grubu (Taklit grubu, TG, YFMŞ+300 µl BY , PPD enjektörü ile), n=4
- 5.Grup:** STZ grup, 25 µg/ml sitrat tampon içerisinde 45mg/kg STZ, n=4
- 6.Grup:** STZ + YDKH grubu (sitrat tamponu içinde 45mg/kg i.p STZ+300 µl BY içinde/ 1.000.000 hücre, PPD enjektörü ile), n=4

Tüm gruplarda ki hayvanların şekeri deney öncesi ve 4 haftada bir ölçüldü. Kontrol gruba hiçbir işlem yapılmadı. STZ grubuna başlangıçta intraperitoneyal olarak 45mg/kg dozla STZ enjekte edildi. YFMŞ grubu sadece YFMŞ içeren içme suyu ile beslendi tedavi yapılmadı. Tüm gruplarda ki hayvanların yarısı deneyin 4. haftasında kalan yarısı ise deneyin 8. haftasında yüksek doz anestezi ile öldürülerek over dokuları alındı ve histolojik olarak incelenmek üzere formaldehid ile fiksasyonu takiben parafin kesitleri alınarak H-E ile boyandı (Dağdelen H 2011).

KH erişkin dişi sıçanların yağ dokusundan toplandı ve yapışma özelliklerinden yararlanarak kültür ortamında çoğaltıldı, konfluent olmuş hücreler toplanarak

transferleri yapıldı. YDKH uygulanacak olan gruplara haftada bir, 300 µl medyum içinde 1×10^6 hücre olacak şekilde KH interperitoneal olarak enjenkte edildi (Chen ve ark. 2014).

Gruplar arasındaki farklar alınan görüntülerin dijital ortama aktarılması sonrasında morfometrik olarak analiz edilecek ve istatistiksel olarak farklar ortaya çıkartıldı. Gruplar arasında oksidatif stres açısından indirek immunohistokimyasal yöntemle eNOS ve iNOS için primer antikolar kullanılarak boyanan preparatlar TUNEL ile de apoptosis için karşılaştırıldı (Fırat F 2013).

5.2 Hayvanların Ağırlık Ölçümü

Deney gruplarında, hayvanların başlangıç ve 8 haftalık deneyin sonunda olmak üzere iki kez ağırlıkları ölçüldü. Deney hayvanlarının son ağırlıklarıyla ilk ağırlıklarının farkı yüzde değişim olarak hesaplandı.

5.3 Hayvanların Açlık Kan Şeker Ölçümü

Deney gruplarındaki hayvanların açlık kan şekerleri bir gün önceden hayvanlar 12 saat süre boyunca aç bırakıldıktan sonra kuyruk kısmından kan örnekleri alınarak ölçüldü. Tüm grupların açlık kan şekerleri deney öncesi, STZ ve YFMSŞ uygulama sonrası 4.hafta ve 8.hafta olmak üzere üç kez ölçüldü. Toplam üç kez ölçülen kan şeker değerleri istatistiksel analizler ile karşılaştırıldı.

5.4 Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücre Kültürü

Sıçanın dorsal kütanoz dokusunun altından elde edilen yağ dokusu alfa-MEM mediumu içerisinde mekanik ayrıştırma yöntemi ile ayrıştırıldı ve eksplant kültür yöntemi ile kültür edildi. 25 cm^2 'lik hücre kültür kabı içinde kültür meydumuna alınan hücreler 37°C 'de ve %5 CO_2 koşulunda inkübe edildi (HeraCell, Kendro Laboratory, Almanya). Kültür kabinde ki yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının alınması ile uzaklaştırıldı ve hücre kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan hücrelere alfa-MEM eklenerek çoğaltıldı. Hücreler konfülent olduğunda tripsin eklenerek pasajlandı. Deneyde 3.pasajdan sonraki hücreler kullanıldı (Deng ve ark. 2014).

5.5 Vaginal Yayma Preperatları Hazırlanması ve Grupların Oluşturulması

Sıçanlardan vaginal yayma preperatı, yayma fırçaları ile vaginal sürüntü yapılarak alındı. Alınan sürüntü lama düzgün bir şekilde yayılarak metanol ile 5 dakika Süreyle tespit edildi. Ardından Giemsa boyası ile 10 dakika boyandı. Musluk suyu ile yıkanan örnekler kurumaya bırakıldı. Daha sonra, lamel ile kapatılarak, mikroskop altında incelenerek aşağıda belirtilen grupların ayrılması sağlandı.

Proöstrus grubu yaymanın parlak renkte olduğu, intermedier hücrelerin yoğun, parabazal hücrelerin ve mukusun nadir olduğu, lökositlerin gözlenmediği preperatlar olarak belirlendi. Östrus grubu yaymanın ayrı ayrı bulunan keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden oluştuğu, gruplar halinde şekillendikleri preperatlar olarak belirlendi. Metöstrus grubu bir kısmında sitoplazmik vakuollerin yer aldığı sıkıca paketlenmiş çok sayıda nükleuslu epitel hücresi ve çok sayıda artmış nötrofil gözlenen grup olarak belirlendi. Diöstrus yaygın olarak lökositlerin ve aralarında parabazal ve intermedier hücrelerin izlendiği preperatlar olarak belirlendi (Gözükaya 2013).

5.6 Parafin Doku Takibi

Formaldehit ile tespit edilen over dokuları, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika % 60'dan % 95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi ve 1'er saat olmak üzere %100 alkolden geçirildi. Ardından 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 50'er dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu ve 60°C'lik etüv içersinde 30 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Dokuların özelliklerine göre etiketlendi (**Tablo 5.6.1**).

Tablo 5.6.1. Parafin doku takip protokolü:

İŞLEM	KİMYASALLAR	SÜRE
DOKU FİKSASYONU	% 10 Formalin	24-48 saat
	Akar su	24 saat
DEHİDRASYON	% 60 Alkol	30 dakika

	% 70 Alkol	30 dakika
	% 80 Alkol	30 dakika
	% 95 Alkol	30 dakika
	% 100 Absolü alkol	1 saat
	% 100 Absolü alkol	1 saat
ŞEFFAFLAŞTIRMA	Alkol:Ksilen (1:1)	30 dakika
	Ksilen I	1 saat
	Ksilen II	1 saat
İNFİLTRASYON	Ksilen-parafin (1:1)	30 dakika
	Parafin I	1 saat
	Parafin II	1 saat
GÖMME	Parafin	

5.7 Hematoksilen-Eozin Boyaması

Tüm grupta ki over doku örneklerinden H-E ve immünohistokimya boyamaları için Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µm'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüve bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için 2'şer dakika %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. 2 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler asit alkola batırılıp çıkarıldıktan sonra tekrar 5 dakika akarsuda yıkandı ve 30 saniye eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (**Tablo 5.7.1**).

Tablo 5.7.1. Hematoksilen-eozin boyama protokolü:

İŞLEM		SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°c Etüvde	1 gece
DEPARAFİNİZASYON	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
REHİDRATASYON	% 95 Alkol	2 dakika
	% 80 Alkol	2 dakika
	% 70 Alkol	2 dakika
	% 60 Alkol	2 dakika
YIKAMA	Akar su	5 dakika
BOYAMA	Hematoksilen	5 dakika
YIKAMA	Akar su	5 dakika
DİFERANSİYASYON	Asit-Alkol	1-2 saniye
YIKAMA	Akar su	5 dakika
BOYAMA	Eozin	3 dakika
YIKAMA	Akar su	5 dakika
	% 80 Alkol	1 dakika
	% 95 Alkol	1 dakika
KURUTMA	Havada veya Etüvde	
	Ksilen	1 saat
KAPAMA	Entellan	

5.8 İndirekt İmmunohistokimya Boyaması:

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar eNOS (sc-

651, Santa Cruz Biotechnology, Germany), iNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Germany) ve VEGF (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Germany) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidad ikincil antikorunu (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminobenzidin (DAB) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf veya yok ile (+1) ile şiddetli (+5) olarak değerlendirenin grupları bilmediği şekilde değerlendirildi (Gözükaya 2013).

5.9 TUNEL İmmunohistokimyası

TUNEL Yöntemi İle apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Doku kesitleri %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında fiske edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml proteinase K 20 dakika doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapıldı. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitler 5- 10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde konarak tutuldu. 15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 3- 5 dakika hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandıktan sonra DAB ile boyama yapıldı ve birkaç kere distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif

hücreler saptanmaya çalışıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS kullanıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirmede preparatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + (1) ile + (5) olarak körlemesine semi-kantitatif puanlama yapıldı. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi (Fırat F 2013).

5.10 İstatistiksel Analizler

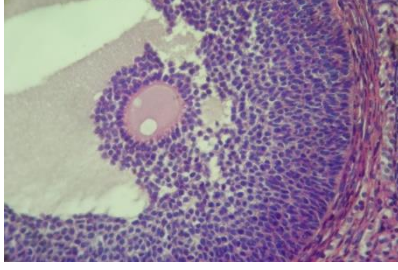
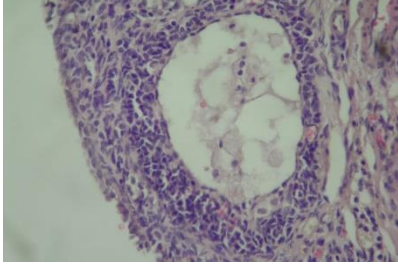
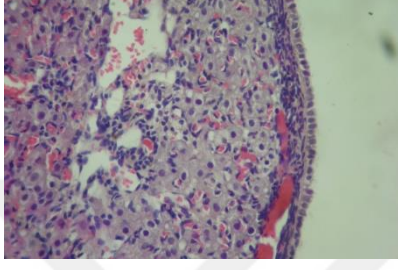
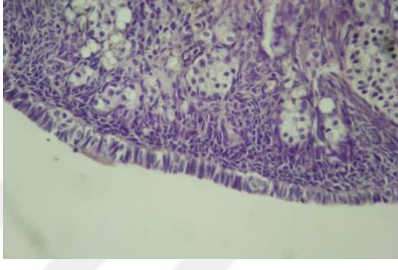
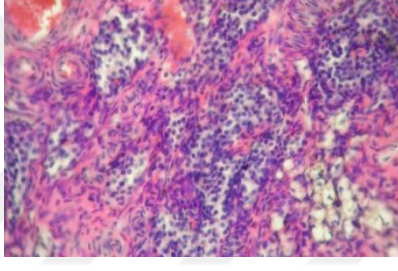
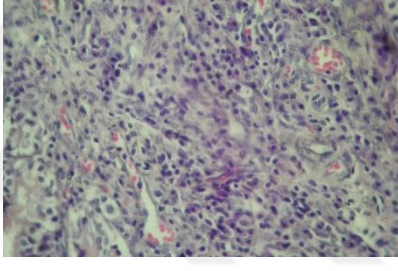
Vücut ağırlığı ve TUNEL ile boyanmış primordiyal, primer, sekonder foliküller, korpus luteum ve kistteki apoptoz gösteren hücre sayıları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında fark belirlendiğinde hangi gruplar arasında fark olduğunu anlamak içinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Antral folikül sayıları ve antral foliküldeki TUNEL ile boyanmış apoptoz gösteren hücrelerin sayısı tek yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında fark belirlendiğinde hangi gruplar arasında fark olduğunu anlamak için Tukey HSD testi ile karşılaştırıldı.

Verilerin kaydedilmesi ve istatistiksel değerlendirmeler için Graphpad programından yararlanıldı. Gruplar arası farklılığın araştırılmasında Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı. Anlamlı bulunması üzerine post hoc ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann-Whitney U testi kullanıldı. Değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri için minimum, maksimum ve medyan değerleri verildi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ değeri olarak kabul edildi (Gözükaya 2013).

5.11 Histolojik boyamaların skorlanması

Histolojik inceleme için H-E, immünohistokimya ve TUNEL boyama preparatları boyama sonrası skora yapıldı. H-E boyamaları folikül sayısı, folikül morfolojisi, oosit morfolojisi, stromadaki kanlanma durumu, germinal epitel kalınlığı ve tunika albuginea kalınlığı açısından değerlendirildi. Belirgin oosit ve zona pelusidaya sahip foliküle 5 puan, oosit yok veya morfolojik olarak değişim göstermiş, zona pelusidadan yoksun foliküle 1 puan verildi. Tek katlı kübik hücrelerden oluşan germinal epitele 5 puan, alçak prizmatik veya prizmatik hücreler içeren germinal epitele 1 puan verildi. Kanlanmanın orta düzeyde fibroz yapılar az veya yok olan stromaya 5 puan, kanlanma artmış fibroz dokuların belirginleştiği stromaya 1 puan verildi (**Tablo 5.11.1**).

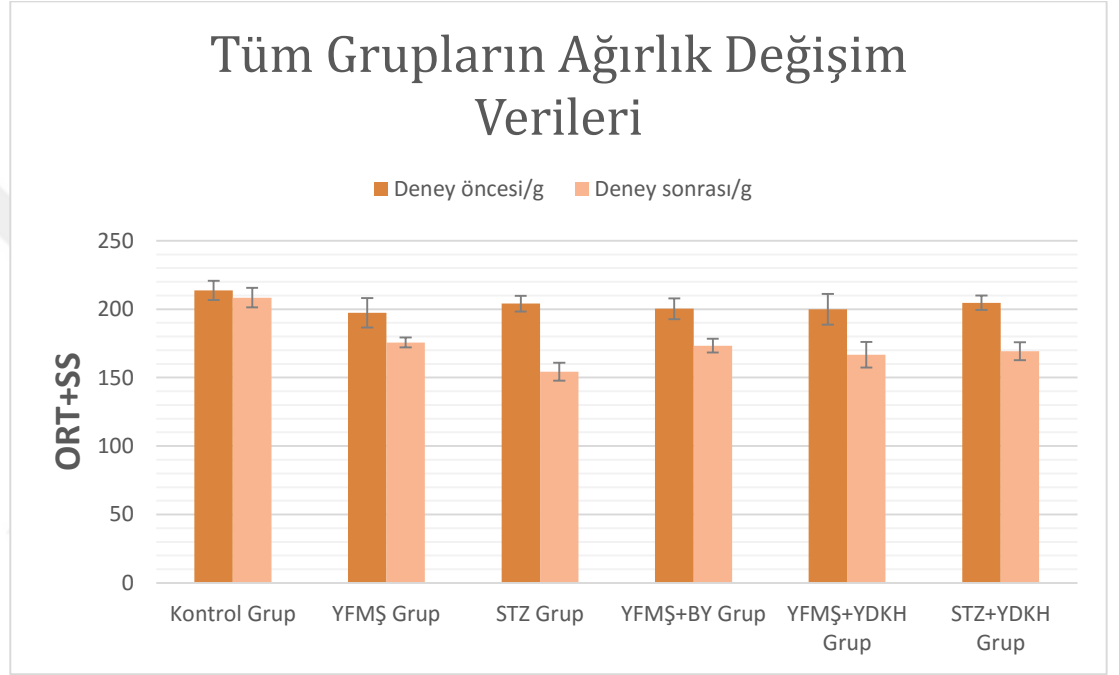
Tablo 5.11.1, H-E boyama sonrası skorlama kriterleri.

	5 puan	1 puan
Folikül		
Germial epitel		
Stroma		

İmmünohistokimya ve TUNEL boyama skorlamaları preparatlarıdaki boyanan hücrelerin sayımı ile gerçekleştirildi. Pozitif boyalı hücrelerin oranı $< 1/100$ ise 1; $1/100$ ile $1/10$ arasında ise 2; $1/10$ ile $3/10$ arasında ise 3; $3/10$ ile $1/3$ arasında ise 4; $2/3$ 'den fazla ise 5 verildi (Yılmaz Dilsiz 2012).

6. BULGULAR

Deneklerde deney boyunca enfeksiyon veya benzeri bir durum saptanmadı ve YFMŞ veya STZ uygulamasına bağlı olarak herhangi bir patoloji ya da ölüm görülmedi. KG vücut ağırlıkları (**Resim 6.1**) deney öncesi ve sonrası değişmez iken YFMŞ ve STZ gruplarında azalma izlendi ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,001$) bulundu (**Tablo 6.1**).



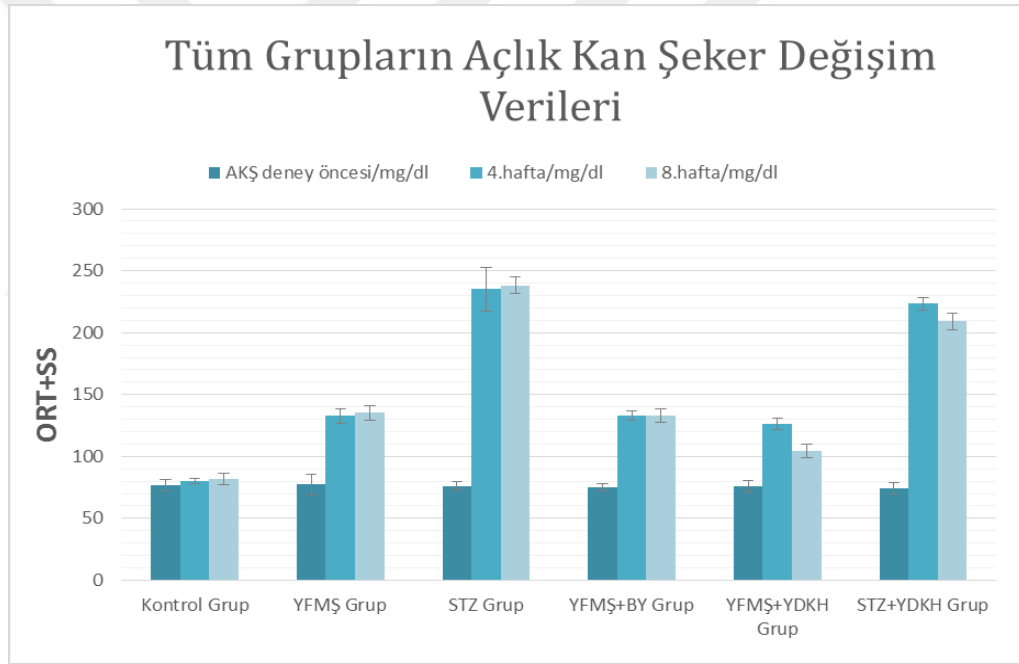
Resim 6.1 Vücut Ağırlıkları. KG ile karşılaştırıldığında YFMŞ ve STZ gruplarında anlamlı ($P<0,001$) bir azalma olduğu görüldü.

Tablo 6.1 Deney Gruplarının VA Verilerinin İstatistiği

Comparison	Difference	q	P value
DÖ-KG vs DS-KG	6,000	1,404	ns $P>0,05$
DÖ-YFMŞ vs DS-YFMŞ	-6,000	1,404	ns $P>0,05$
DÖ-STZ vs DS-STZ	49,670	11,621	*** $P<0,001$
DÖ-YFMŞ+BY vs DS-YFMŞ+BY	27,000	6,317	** $P<0,01$
DÖ-YFMŞ+YDKH vs DS-YFMŞ+YDKH	33,330	7,798	*** $P<0,001$
DÖ-STZ+YDKH vs DS-STZ+YDKH	35,340	8,268	*** $P<0,001$
DS-KG vs DS-YFMŞ	11,000	2,574	ns $P>0,05$
DS-KG vs DS-STZ	54,000	12,634	*** $P<0,001$
DS-KG vs DS-YFMŞ+BY	35,000	8,189	*** $P<0,001$
DS-KG vs DS-YFMŞ+YDKH	41,660	9,747	*** $P<0,001$

DS-KG vs DS-STZ+YDKH	39,000	9,125	***	P<0,001
DS-YFMŞ vs DS-YFMŞ+YDKH	30,660	7,173	***	P<0,001
DS-STZ vs DS-STZ+YDKH	-15,000	3,509	ns	P>0,05

Deneklerde AKŞ düzeylerine bakıldığında (**Resim 6.2**) KG değişmez iken YFMŞ ve STZ uygulamasına bağlı olarak artan ayrıca YFMŞ ile karşılaştırıldığında STZ için daha da anlamlı ($p<0,001$) bir yükselme bulundu (**Tablo 6.2**). YFMŞ ve STZ uygulanan grupların kendi aralarında 4.hafta ve 8.hafta AKŞ’i karşılaştırıldığında AKŞ’indeki yükseliş istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) fark görmedi. YDKH uygulama sonrası hem YFMŞ grubu hem STZ grubunda AKŞ’inde düşüş saptandı ancak bu düşüş sadece YFMŞ uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu.



Resim 6.2 AKŞ. YFMŞ ve STZ uygulanan gruplarda AKŞ’i belirgin ($p<0,001$) olarak yükseldi. YDKH uygulama sonrası YFMŞ uygulanan gruplarda AKŞ’inde anlamlı ($p<0,001$) düşüş saptandı.

Tablo 6.2 Deney Gruplarının AKŞ Verilerinin İstatistiği

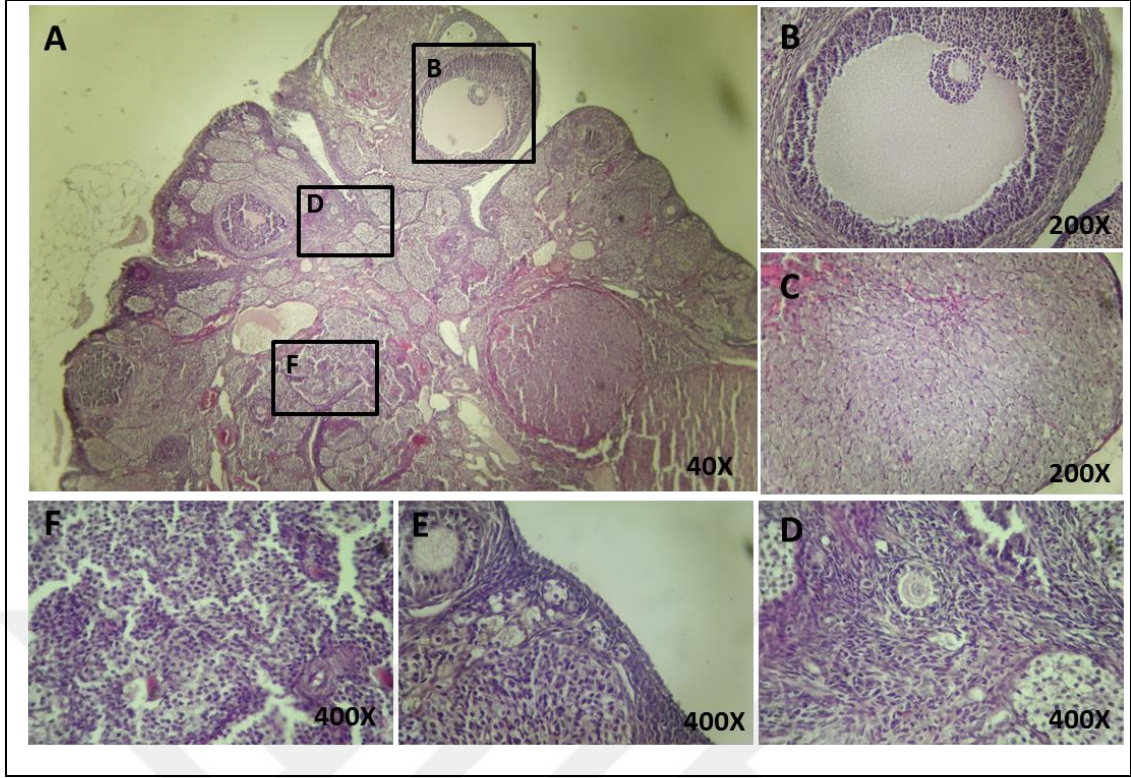
Comparison	Difference	q	P value
DÖ-KG vs DÖ-YFMŞ	-0,6600	0,2245	ns P>0,05
DÖ-KG vs DÖ-STZ	0,3400	0,1157	ns P>0,05
DÖ-KG vs DÖ-YFMŞ+BY	1,340	0,4559	ns P>0,05

DÖ-KG vs DÖ-YFMŞ+YDKH	1,000 0,3402 ns P>0,05
DÖ-KG vs DÖ-STZ+YDKH	2,670 0,9084 ns P>0,05
DÖ-KG vs 4h-KG	-3,660 1,245 ns P>0,05
DÖ-KG vs 8h-KG	-5,330 1,813 ns P>0,05
4h-KG vs 8h-KG	-1,670 0,5682 ns P>0,05
DÖ-YFMŞ vs 4h-YFMŞ	-55,340 18,827 *** P<0,001
DÖ-YFMŞ vs 8h-YFMŞ	-58,000 19,732 *** P<0,001
4h-YFMŞ vs 8h-YFMŞ	-2,660 0,9050 ns P>0,05
DÖ-STZ vs 4h-STZ	-158,67 53,981 *** P<0,001
DÖ-STZ vs 8h-STZ	-162,00 55,114 *** P<0,001
4h-STZ vs 8h-STZ	-3,330 1,133 ns P>0,05
DÖ-YFMŞ+BY vs 4h-YFMŞ+BY	-57,670 19,620 *** P<0,001
DÖ-YFMŞ+BY vs 8h-YFMŞ+BY	-57,670 19,620 *** P<0,001
4h-YFMŞ+BY vs 8h-YFMŞ+BY	0,000 0,000 ns P>0,05
DÖ-YFMŞ+YDKH vs 4h-YFMŞ+YDKH	-50,330 17,123 *** P<0,001
DÖ-YFMŞ+YDKH vs 8h-YFMŞ+YDKH	-29,000 9,866 *** P<0,001
4h-YFMŞ+YDKH vs 8h-YFMŞ+YDKH	21,330 7,257 *** P<0,001
DÖ-STZ+YDKH vs 4h-STZ+YDKH	-149,33 50,804 *** P<0,001
DÖ-STZ+YDKH vs 8h-STZ+YDKH	-135,00 45,929 *** P<0,001
4h-STZ+YDKH vs 8h-STZ+YDKH	14,330 4,875 ns P>0,05
4h-STZ vs 4h-STZ+YDKH	11,670 3,970 ns P>0,05
4h-YFMŞ+BY vs 4h-YFMŞ+YDKH	7,000 2,381 ns P>0,05
4h-YFMŞ+YDKH vs 4h-STZ+YDKH	-97,330 33,113 *** P<0,001
4h-STZ+YDKH vs 8h-STZ+YDKH	14,330 4,875 ns P>0,05
8h-KG vs 8h-YFMŞ	-53,330 18,143 *** P<0,001
8h-KG vs 8h-STZ	-156,33 53,185 *** P<0,001
8h-KG vs 8h-YFMŞ+BY	-51,000 17,351 *** P<0,001
8h-KG vs 8h-YFMŞ+YDKH	-22,670 7,713 *** P<0,001
8h-KG vs 8h-STZ+YDKH	-127,00 43,207 *** P<0,001
8h-YFMŞ vs 8h-STZ	-103,00 35,042 *** P<0,001
8h-YFMŞ vs 8h-YFMŞ+BY	2,330 0,7927 ns P>0,05
8h-YFMŞ vs 8h-YFMŞ+YDKH	30,660 10,431 *** P<0,001
8h-STZ vs 8h-STZ+YDKH	29,330 9,978 *** P<0,001
8h-YFMŞ+BY vs 8h-YFMŞ+YDKH	28,330 9,638 *** P<0,001
8h-YFMŞ+BY vs 8h-STZ+YDKH	-76,000 25,856 *** P<0,001
8h-YFMŞ+YDKH vs 8h-STZ+YDKH	-104,33 35,494 *** P<0,001

KG için sıçanların uygulama sonrası 1 ve 2 aylık ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde morfolojik olarak benzer durumda oldukları görüldü. Organın dışında tek katlı kübik epitel ile epitelin altında ise yoğun olarak bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan tunika albuginea görüldü. Ovaryum kesitlerinde iki bölge ayırt edildi. Ovaryumda tunika albuginea altında yer alan korteks bölgesinde, çeşitli sayı ve tipte foliküllerin olduğu gözlemlendi. Foliküllerin arasında stromada yer alan hücreler gruplar halinde oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilikti. Foliküllerin etrafında ayrıca düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri görüldü. Kortekste damar kesitlerine az sayıda rastlandı. Ovaryum

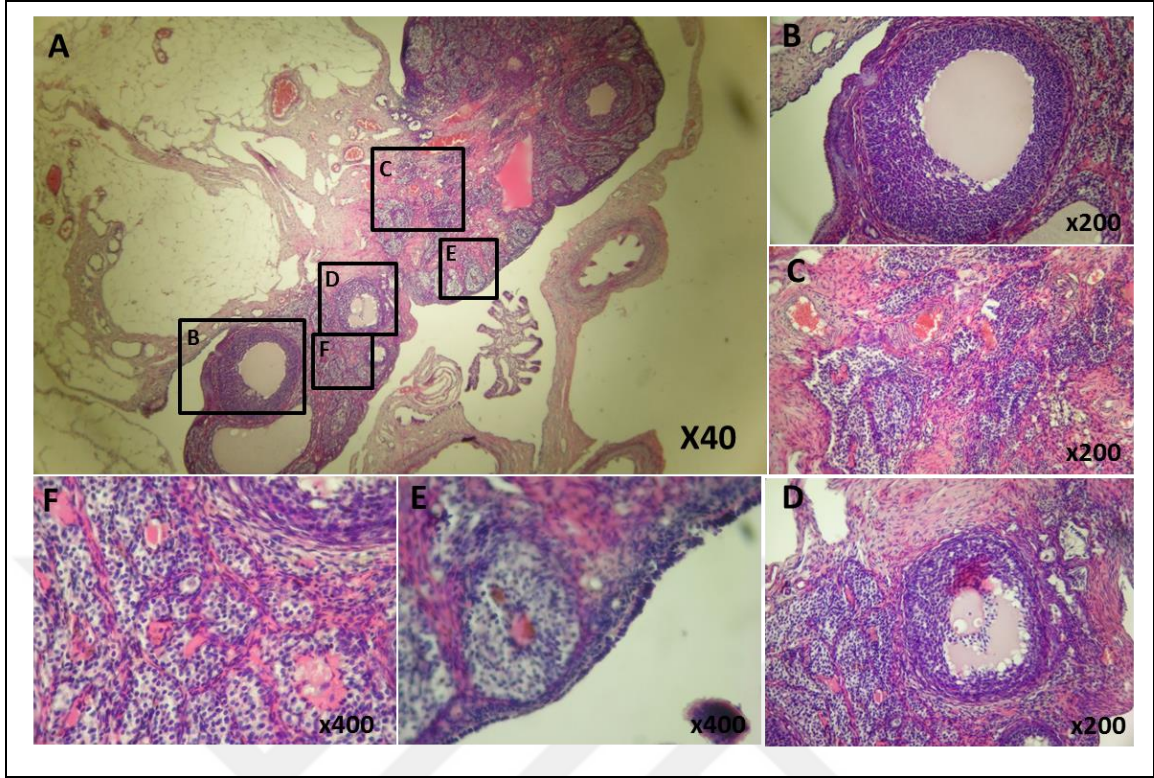
korteksinde çok sayıda primordiyal folikül gözlemlendi. Primordiyal foliküllerde içte oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granuloza hücreleri yer almıştı. Oosit büyük ökromatik bir nükleusa sahip olup nükleolusu belirgindi. Primer foliküllerde oosit çevresinde tek katlı kübik şekilli granuloza hücreleri gözlemlendi. Oosit ile granuloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı. Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granuloza hücreleri ile oosit ve granuloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlemlendi. Sekonder foliküllerde granuloza hücreleri dışında teka folikülü oluşmaya başladığı görüldü. Antral foliküllerde çok tabakalı granuloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı. Bazı antral foliküllerde boşluklar birleşerek antrum oluşturmuştu. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granuloza hücrelerinin birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti (**Resim 6.3 A**).

Bu foliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlemlendi. Teka internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen lifleride gözlemlendi. Kortekste ayrıca korpus luteum ve içi sıvı ile dolu bir boşluğu olan iki üç sıralı granuloza hücrelerinin çevrelediği folikül kistleri gözlemlendi. Korpus luteumun orta kısımlarında büyük ökromatik nükleuslu ve sitoplazmaları açık renkte boyanmış hücreler ile kenar kısımlarında ise daha küçük hücreler gözlemlendi. Ayrıca korpus luteumun orta kısımlarında kan damarları da yer almaktaydı. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de görüldü. Bununla birlikte medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlemlendi (**Resim 6.3 B, C, D, E, F**).



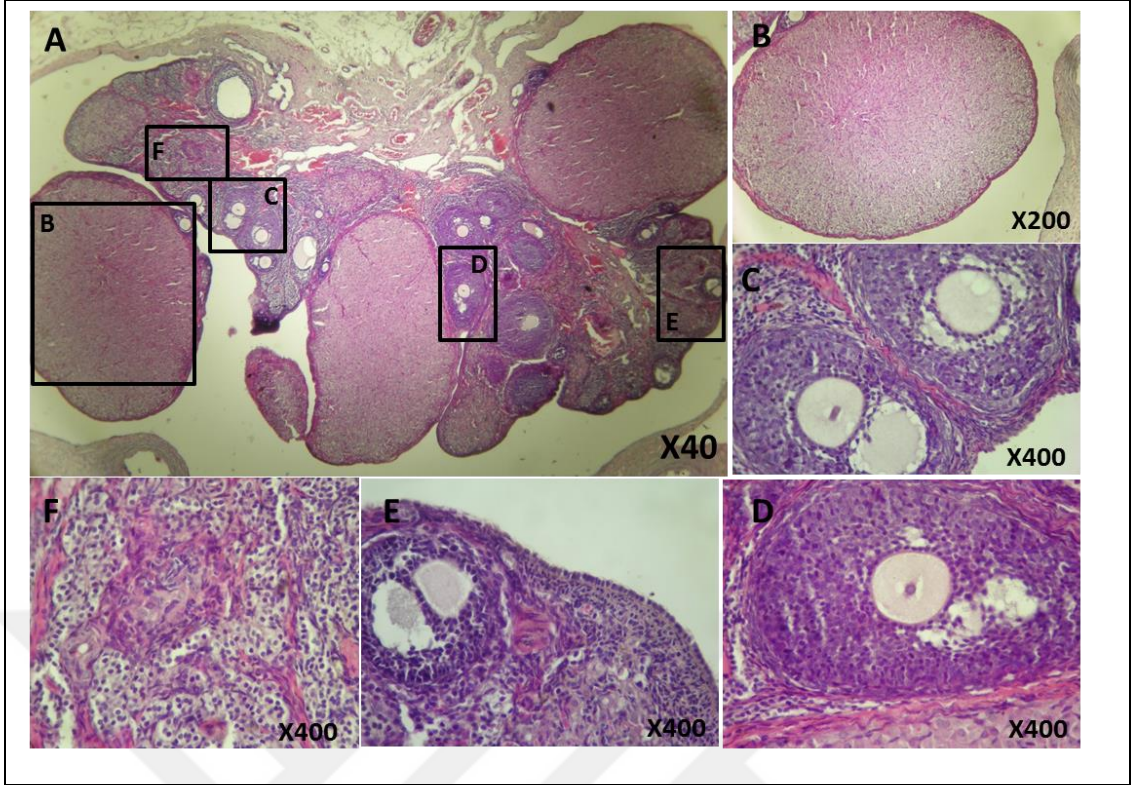
Resim 6.3 KG örneklerinde H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), medulla (F), korpus luteum (C) germinal epitel (E) histolojik bulgularında normal bir morfoloji gözlemlendi.

YFMŞ grubu sıçanların uygulama sonrası 1. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak kortekste folikül ve korpus luteumun yer aldığı, medullada ise konjesyon özelliği gösteren vasküler yapıların yer aldığı bulundu (**Resim 6.4 A**). YFMŞ sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde kortekste çeşitli çaplarda primer, sekonder ve Graaf follikülleri ile korpus luteumun izlendi. Poligonale eozinofilik boyanan granüloza ve teka hücreleri folikül çevrelerinde oldukça belirgin biçimde izlendi. Dışta tek sıralı kübik germinal epitel, altında sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea izlendi. Oosit etrafında zona pellusida, granüloza hücrelerinin aralarında antrumun gelişmesi ile sekonder ve Graaf folliküllerinin oluştuğu, folliküllerin bağ dokusuna komşu kısmında sıkı bağ dokusu yapısında teka eksterna ve iç kısmında kan damarlarından zengin teka interna yapısı gözlemlendi. Medullada stromal elemanlar ile beraber konjesyon özelliği gösteren vasküler yapılar artmış şekilde gözlemlendi. (**Resim 6.4 B, C, D, E, F**). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında patolojik bulgular olarak artmış konjesyon ve kanlanma, gelişme geriliği gösteren foliküller ve oosit oluşamama durumu, kapsülde kalınlaşma ile parankim ve stromada fibrosis belirtileri izlendi.



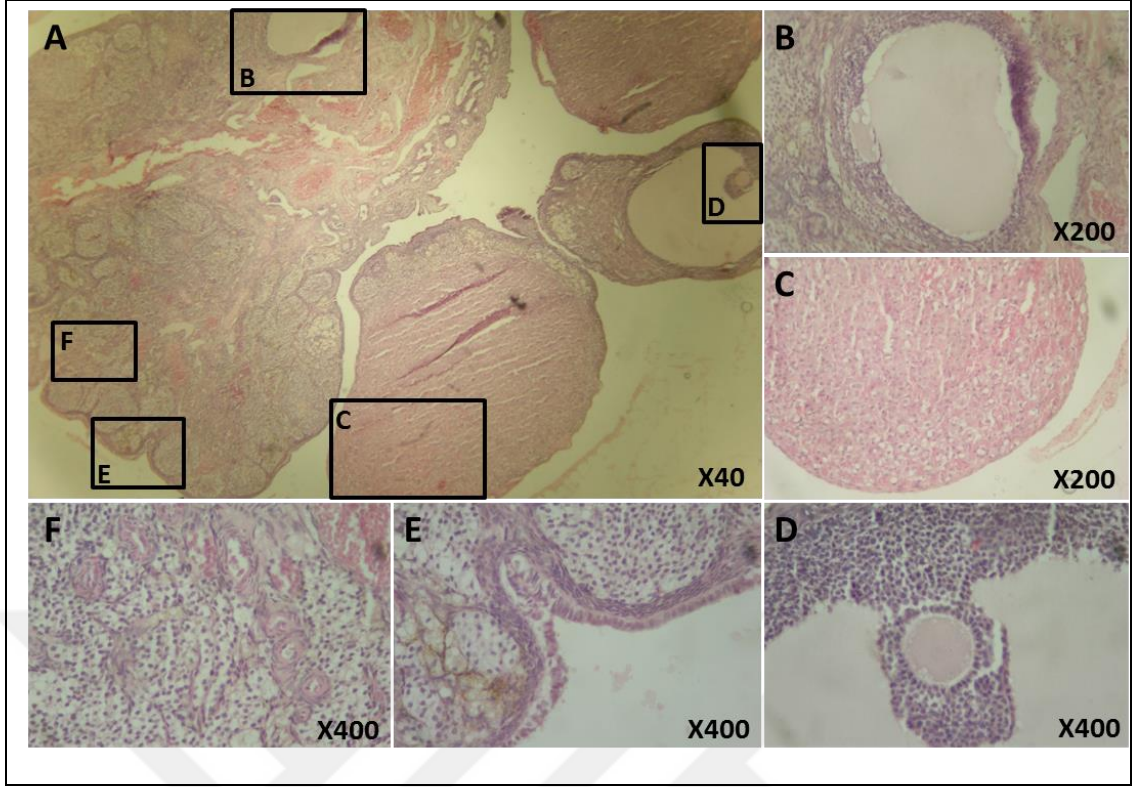
Resim 6.4 YFMS grubu örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D) ve medulla (C, F), tunika albuginya (E). histolojik bulgularında gelişme geriliği gösteren foliküller ve oosit oluşamama durumu ve özellik ile medullada konjesyon gösteren vasküler yapılar izlenmekte.

YFMS grubu sıçanların uygulama sonrası 2. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak kortekste çeşitli boyutlarda foliküller ve artmış korpus luteumun yer aldığı, medullada ise stromal elemanların yer aldığı gözlemlendi (**Resim 6.5 A**). YFMS sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde ovaryumun dıştan tek katlı kübik epitel ile sarılı olduğu ve epitelin hemen altında sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginyanın yer aldığı izlendi. Korteks çeşitli boyutlarda primer, sekonder ve Graf folikül içermekle beraber özellik ile çok sayıda korpus luteumun içerdiği gözlemlendi ve medullada 1.aya göre daha hafif konjesyon gösteren vasküler yapılar izlendi (**Resim 6.5 B, C, D, E, F**). YFMS grubu 2.ay histolojik bulgular ile YFMS grubu 1.ay bulgular karşılaştırıldığında medullada daha hafif konjesyon gösteren vasküler olmasına rağmen iyi gelişmiş Graf folikül sayısının azaldığı gözlemlendi.



Resim 6.5 YFMS grubu örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B,)kortex (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında artmış korpus luteum ve daha hafif konjesyon gösteren vasküler yapılar gözlenmekte.

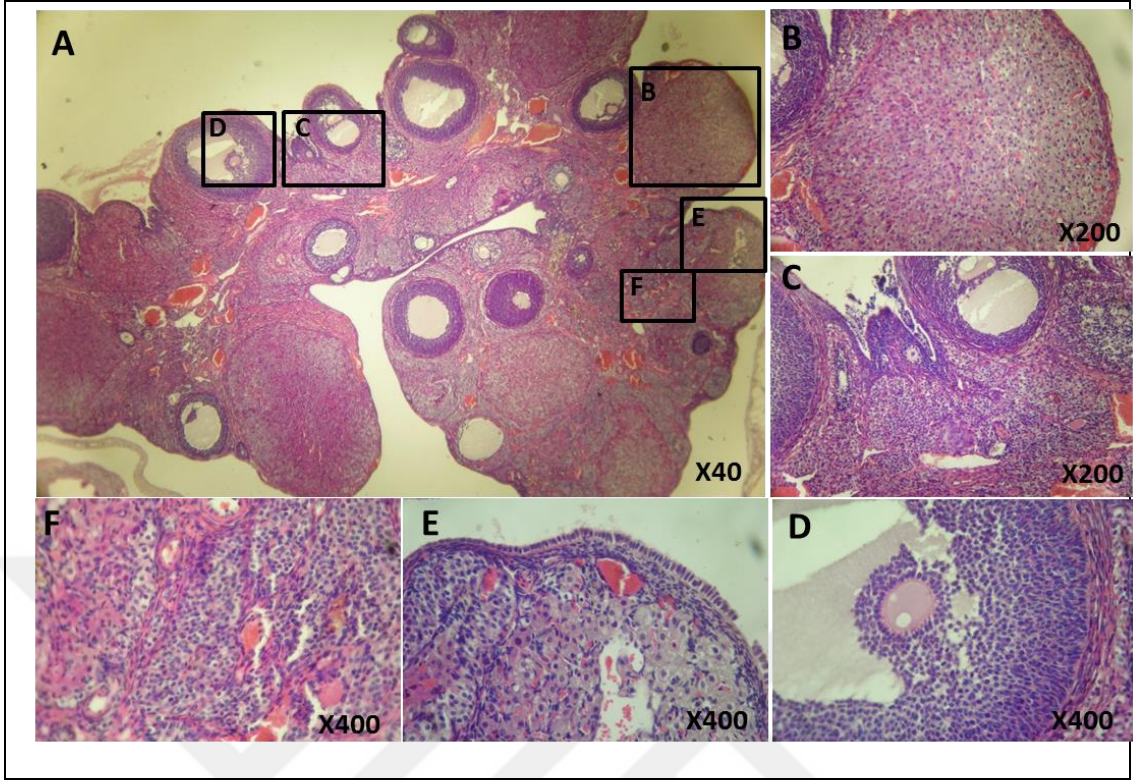
STZ sıçanların uygulama sonrası 2. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak kortekste artmış atrezik foliküller ve korpus luteumun yer aldığı gözlendi, medullanın normal histolojik yapıda olduğu bulundu (**Resim 6.6 A**). STZ sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde korteks büyük kistik yapıda Graf folikül ve çok sayıda atrezik foliküller gözlemlendi. Folikül etrafındaki teka hücrelerinde artış olduğu gözlendi. Tek katlı germinal epitelin alçak prizmatığe dönüştüğü izlendi. Medulla kontrol gruba göre belirgin bir fark göstermedi (**Resim 6.6 B, C, D, E, F**). STZ grubunda ki sıçanların over doku örneklerinde H-E ile boyanma sonrası 1.ay ile 2.ay kesitler benzer bulunduğundan 1.ay kesit resimleri verilmedi. STZ grubu histolojik bulguları ile YFMS grubu bulguları karşılaştırıldığında STZ grubunda folikül gelişimin daha çok hasar gördüğü ancak stromal kanlanmanın YFMS grubunda daha fazla artış gösterdiği saptandı.



Resim 6.6 STZ grubu örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (C, F), histolojik bulgularında büyük kistik Graf folikül ve atrezik foliküller izlendi. Medullada normal bir morfoloji gözlemlendi.

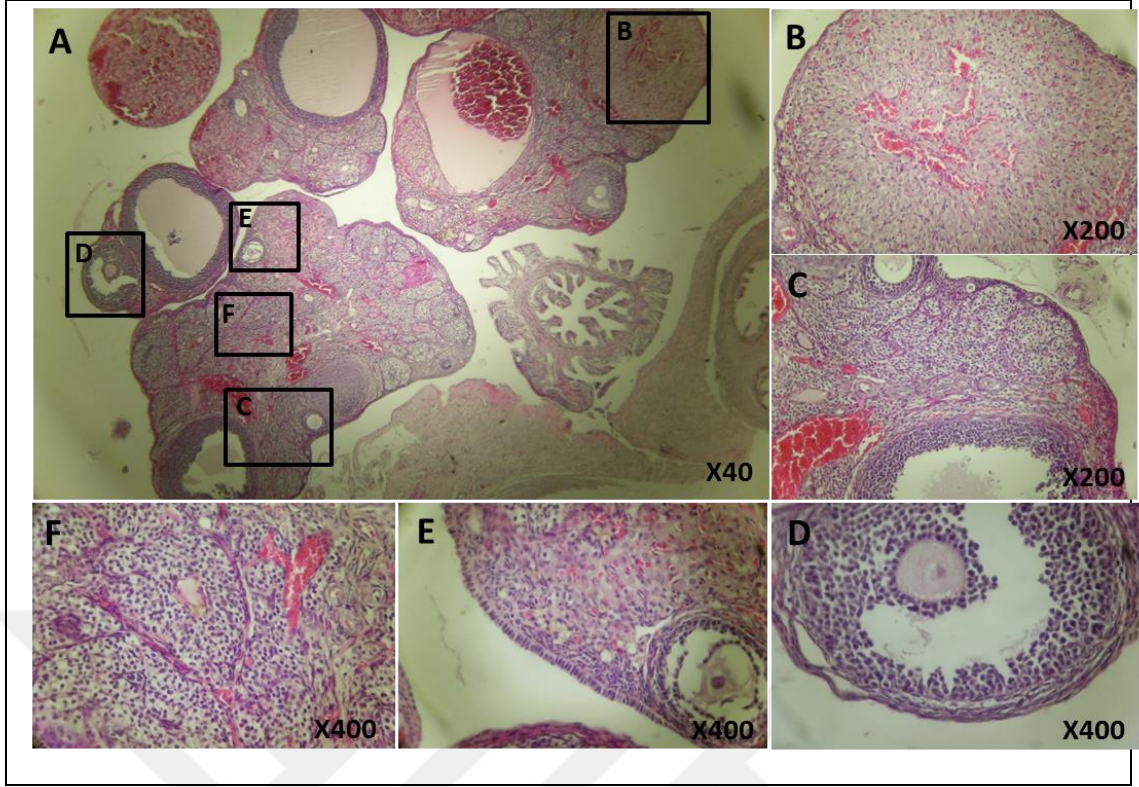
YFMŞ+BY grubu sıçanların uygulama sonrası ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde 1. ve 2.ay sonuçlar YFMŞ grubu sonuçlar ile benzer bulundu ve bu neden ile ayrıyetten resim konulmadı.

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak folikül yapıların ve korpus luteumun kortekste yer aldığı ve medullada stromal elemanların yer aldığı gözlemlendi (**Resim 6.7 A**). YFMŞ+YDKH sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde korteks çok sayıda primer, sekonder ve Graf folikül gözlemlendi. Dışta tek katlı kübik epitel ve onun altında tunika albuginya tabakası izlendi. Foliküllerin granüloza ve teka tabakaları belirgin olarak izlendi. Oosit normal morfolojide ve etrafında pembe boyanan zona pelusida ile döşenmiş şekilde bulundu. Medullada konjesyon özelliği gösteren vasküler yapı dışında normal stromal elemanların yer aldığı bulundu (**Resim 6.7 B, C, D, E, F**). YFMŞ grubu ile karşılaştırıldığında Graf folikül sayısının daha fazla olduğu, gelişme geriliği gösteren foliküllerin daha az olduğu saptandı.



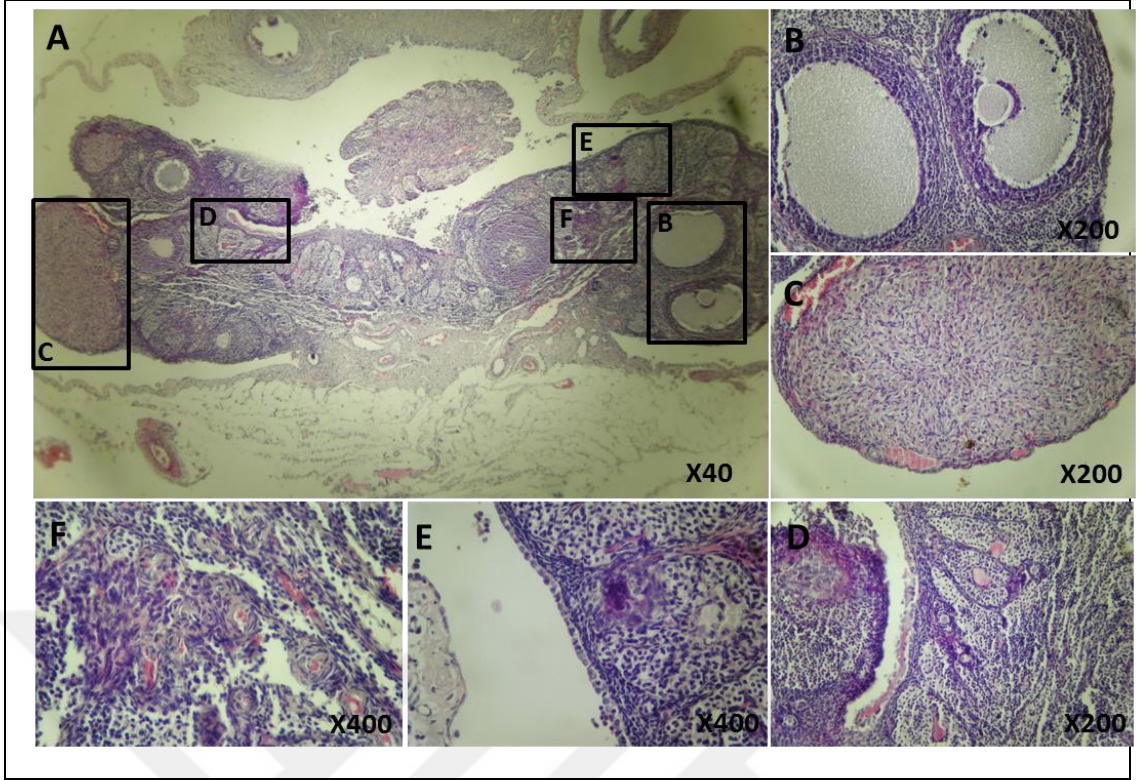
Resim 6.7 YFMS+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında iyi gelişmiş graf folikül ve konjesyon özelliği gösteren vasküler içeren medulla özlemi.

YFMS+YDKH sıçanların uygulama sonrası 2. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak folikül yapıların kortekte yer aldığı ve medullada hafif kanlanma gösteren damarların olduğu bulundu (**Resim 6.8 A**). YFMS+YDKH sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde kortekte çok sayıda Graf folikülün bulunduğu ve bunun ile beraber yeni gelişmekte olan korpus luteumun yer aldığı gözlemlendi. Korteksi dıştan saran tek katlı kübik epitel belirgin olarak izlendi. Medullada çok hafif konjesyon gösteren vasküler bulundu (**Resim 6.8 B, C, D, E, F**). Bu bulgular YFMS+YDKH grubu 1.ay kesitler ile 2.ay kesitlerin bulguları karşılaştırıldığında 2.ay kesitlerde daha hafif stromal kanlanma olduğu gözlemlendi. Graf folikülün 1.ay kesit bulgularına göre daha iyi gelişmiş olduğu saptandı.



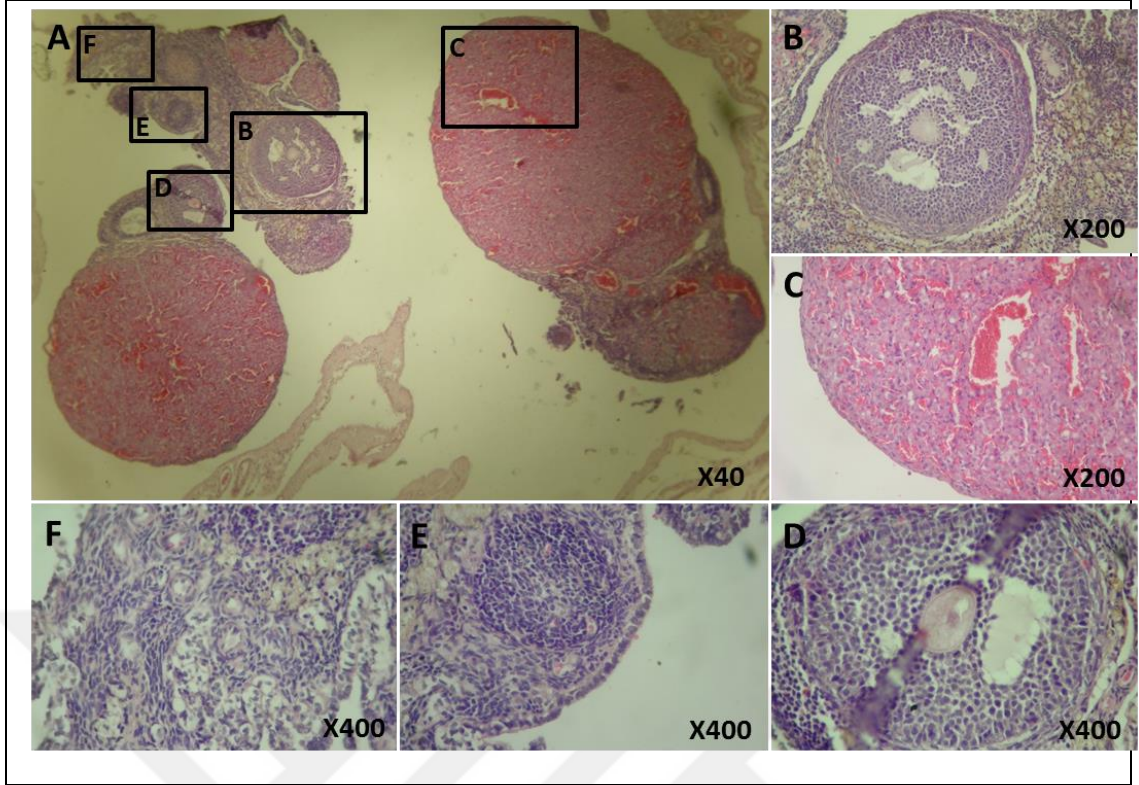
Resim 6.8 YFMS+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında iyi gelişmiş Graf folikül, hafif kanlanma gösteren medulla morfolojisi gözlemlendi.

STZ+YDKH sıçanların uygulama sonrası 1. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak kortekste foliküller ve korpus luteumun bulunduğu ve medullanın normal morfoloji gösterdiği saptandı (**Resim 6.9 A**). STZ+YDKH sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde kortekste iyi gelişmiş Graf folikül ile beraber atrezik foliküller de gözlemlendi. Germinal epitel tek katlı kübik hücrelerden oluşmuş olarak izlendi. Medulla normal morfoloji gösterdi (**Resim 6.9 B, C, D**). STZ+YDKH grubu STZ grubu ile karşılaştırıldığında iyi gelişmiş Graf foliküller artmış olarak bulundu.



Resim 6.9 STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında iyi gelişmiş Graf folikül ve normal bir morfoloji gösteren medulla gözlemlendi.

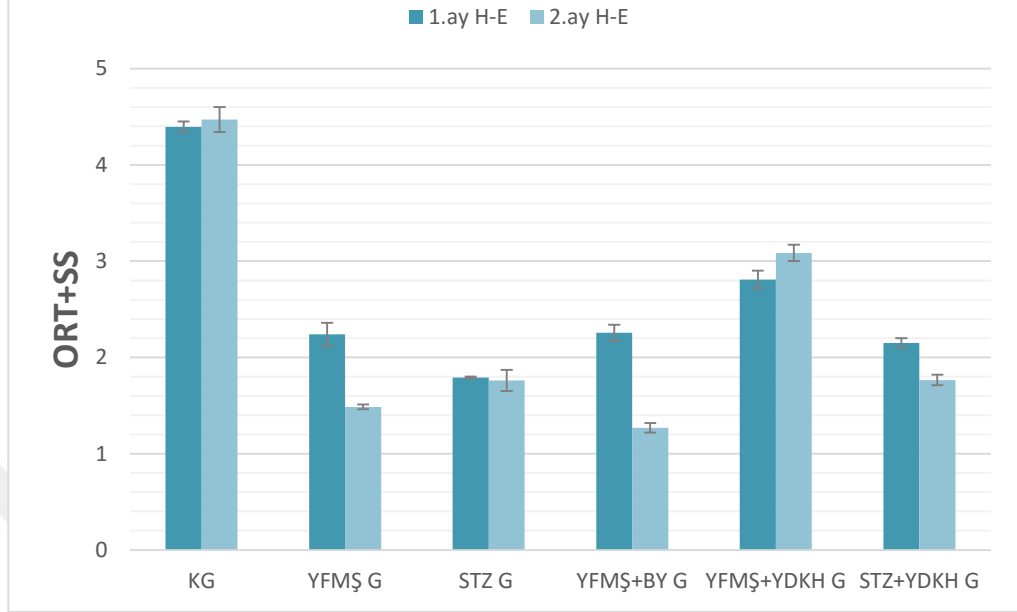
STZ+YDKH sıçanların uygulama sonrası 2. Ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde genel olarak folikül yapıları ve korpus luteum içeren korteks ve normal morfolojide medulla bulundu (**Resim 6.10 A**). STZ+YDKH sıçanların uygulama sonrası 2.ay ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde korteks gelişmekte olan sekonder folikül ve atrezik foliküller gözlemlendi. Aynı zamanda vakuoller içeren yeni gelişmekte olan korpus luteum izlendi. Korteks dıştan tek katlı kübik epitel ile döşenmiş olarak bulundu. Medulla normal morfoloji gösterdi (**Resim 6.10 B, C, D, E, F**). STZ+YDKH grubu 1.ay kesitleri ile 2.ay kesitlerinin H-E boyama sonrası ovaryumları karşılaştırıldığında 2.ay preparatlarda Graf folikül sayısının daha az olduğu saptandı.



Resim 6.10 STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. ay H-E boyaması görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F) histolojik bulgularında azalmış Graf folikül gözlemlendi.

Örneklerin H-E boyamalarında KG ile karşılaştırıldığında YFMŞ ile artan ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir biçimde kontrole göre artmış histopatolojik bulguların olduğu skorlama ile yapılan (**Resim 6.11**) morfometrik analiz ile bulundu (**Tablo 6.3**).

Ovaryum Histolojik Değerlendirme Skoruması



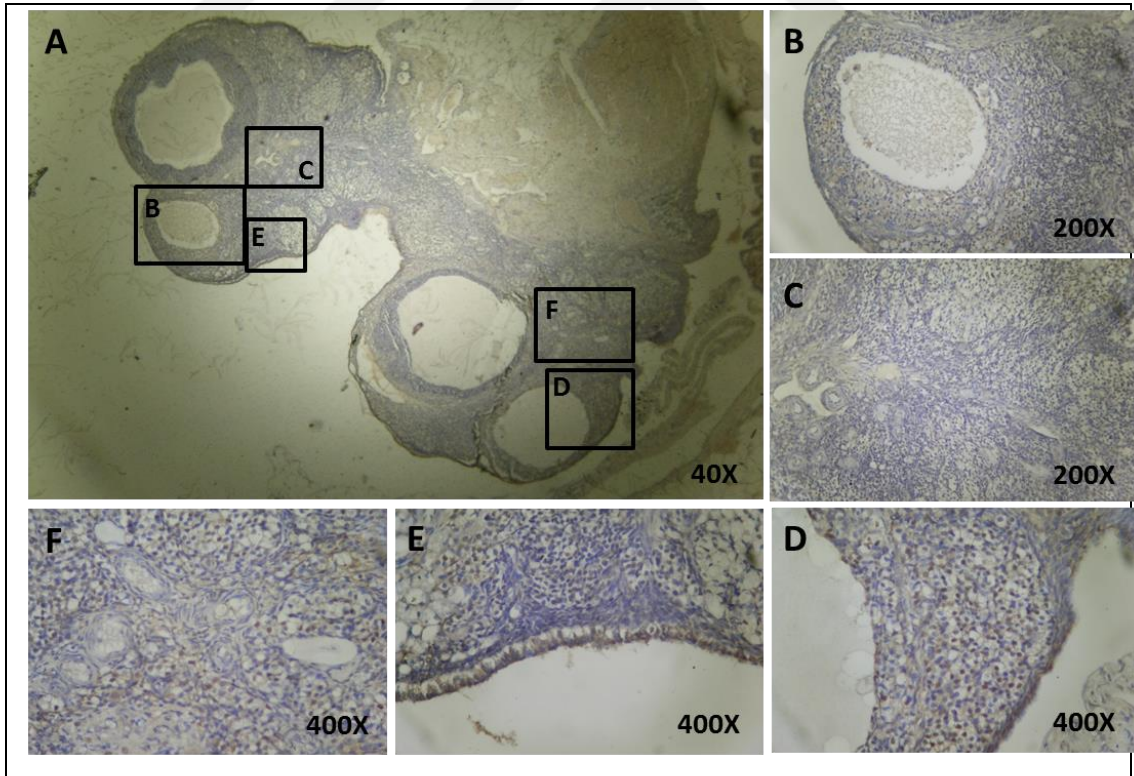
Resim 6.11 Yüksek fruktoz ve STZ uygulanma sonrası H-E boyamaları ile over dokusu üzerindeki histolojik etkilerinin morfometrik analizinde tüm örnekler incelendiğinde özellikle YFMŞ grubunda overin oldukça etkilendiğini görüldü.

Tablo 6.3 Çalışma grupların H-E ile boyama sonrası incelenen kesitlerin morfometrik analiz sonrası istatistik verileri.

Comparison	Difference	q	P value
KG 1.ay H-E vs YFMŞ 1.ay	1,760	47,931	*** P<0,001
KG 1.ay H-E vs STZ 1.ay	2,210	60,186	*** P<0,001
KG 1.ay H-E vs YFMŞ+BY 1.ay	1,740	47,386	*** P<0,001
KG 1.ay H-E vs YFMŞ+YDKH 1.ay	1,190	32,408	*** P<0,001
KG 1.ay H-E vs STZ+YDKH 1.ay	1,850	50,382	*** P<0,001
KG 1.ay H-E vs KG 2.ay H-E	-0,4700	12,800	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs STZ 1.ay	0,4500	12,255	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+BY 1.ay	-0,02000	0,5447	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	-0,5700	15,523	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ 2.ay	0,7500	20,425	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	-0,3600	9,804	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ 2.ay	0,03000	0,8170	ns P>0,05
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	-0,5500	14,978	*** P<0,001
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	0,9900	26,961	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	0,6600	17,974	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-0,2800	7,625	*** P<0,001
STZ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 2.ay	0,3800	10,349	*** P<0,001
KG 2.ay H-E vs YFMŞ 2.ay	2,980	81,155	*** P<0,001

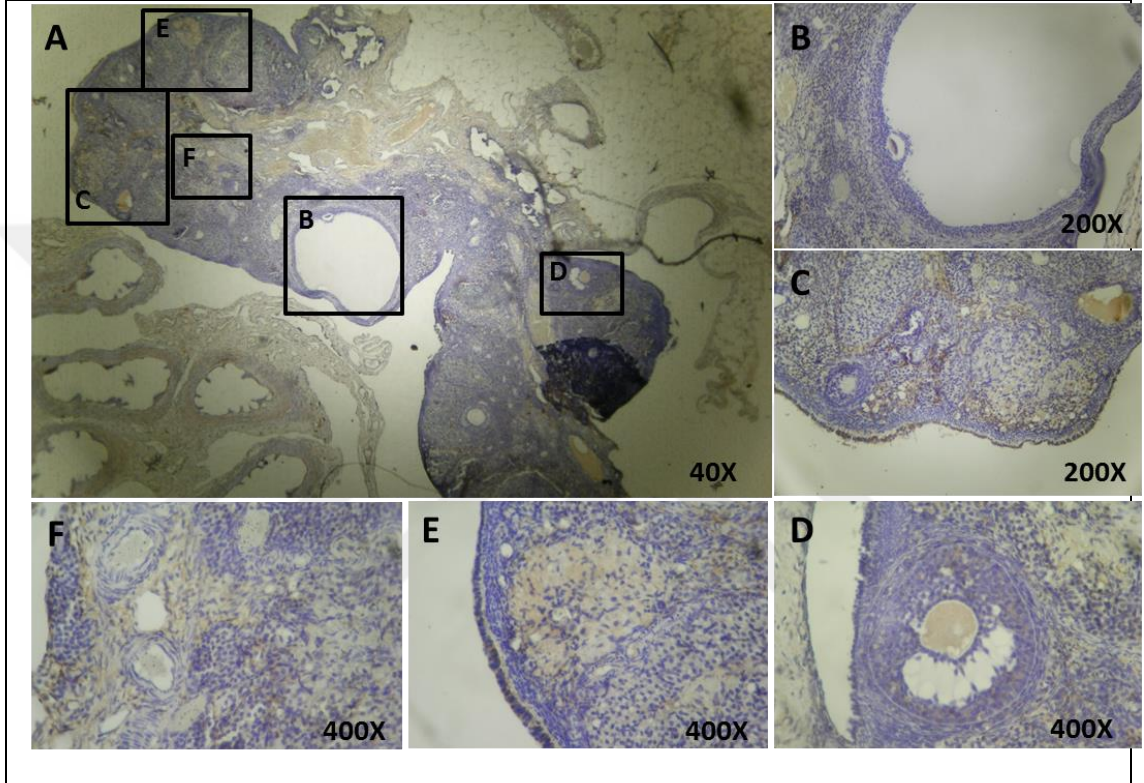
KG 2.ay H-E vs STZ 2.ay	2,710 73,802 *** P<0,001
KG 2.ay H-E vs YFMŞ+BY 2.ay	3,200 87,147 *** P<0,001
KG 2.ay H-E vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,380 37,582 *** P<0,001
KG 2.ay H-E vs STZ+YDKH 2.ay	2,700 73,530 *** P<0,001
YFMŞ 2.ay vs STZ 2.ay	-0,2700 7,353 *** P<0,001
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	0,2200 5,991 ** P<0,01
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-1,600 43,573 *** P<0,001
STZ 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,01000 0,2723 ns P>0,05
YFMŞ+BY 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-1,820 49,565 *** P<0,001
YFMŞ+YDKH 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	1,320 35,948 *** P<0,001

Oksidatif stres için yapılan immunohistokimyasal incelemelerde e-NOS için boyama sonrası KG kesitlerinde folüküllerde granuloza ve teka hücrelerinin boyandığı ancak korpus luteum ile çevresindeki parankimde boyamanın daha da arttığı izlendi (**Resim 6.12**). Germinal epitelde de az miktarda pozitif boyamaların olduğu gözlemlendi (**Resim 6.12 E**). İmmunohistokimyasal boyamalarda e-NOS KG için uygulama sonrası 2.ay sonuçlar 1.ayınki ile benzer olarak saptandı ve bu nedenle resimler verilmedi.



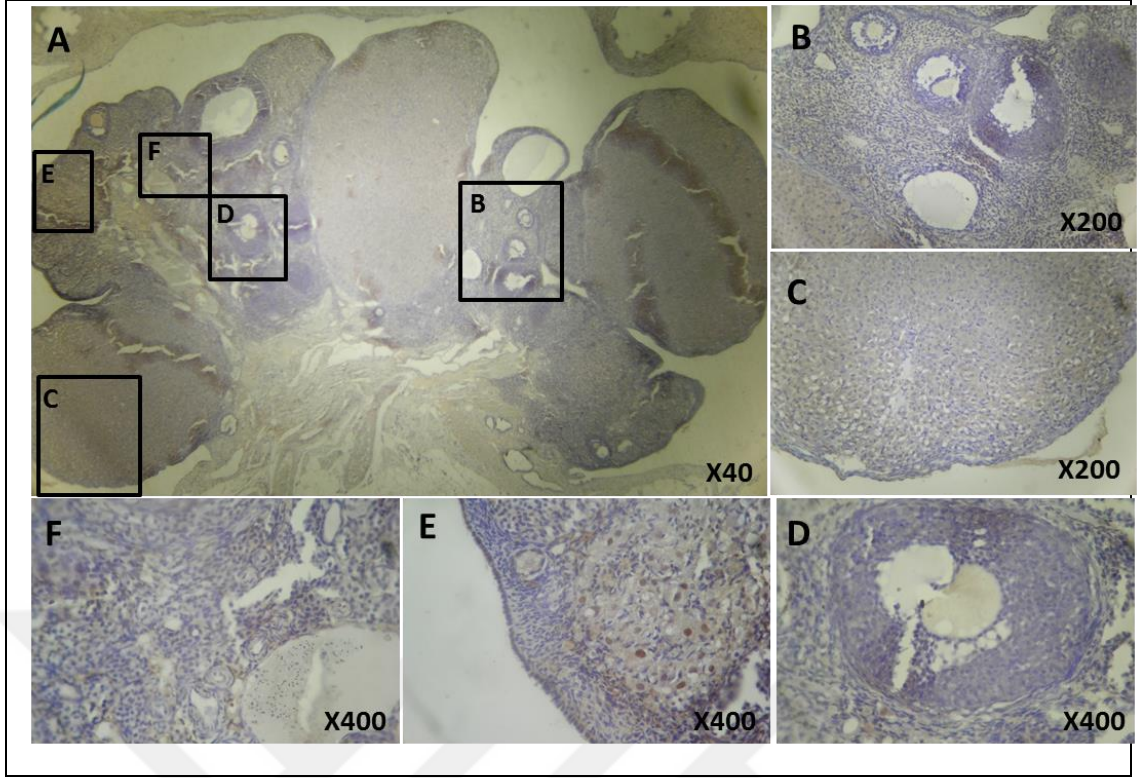
Resim 6.12 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde KG over dokuları e-NOS için boyamalarda genel (A), korteks (B, D), tunika albuginya (E) ve medulla (C, F).

YFMS sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinde hafif boyama ancak stroma ve germinal epitelde artmış e-NOS ekspresyonu saptandı (**Resim 6.13**). YFMS grubu 1.ay e-NOS için immünohistokimya boyamaları KG ile karşılaştırıldığında korteks elemanları benzer boyama özelliği gösterir iken medullada stromal elemanlarda ve germinal epitelde artmış boyama izlendi.



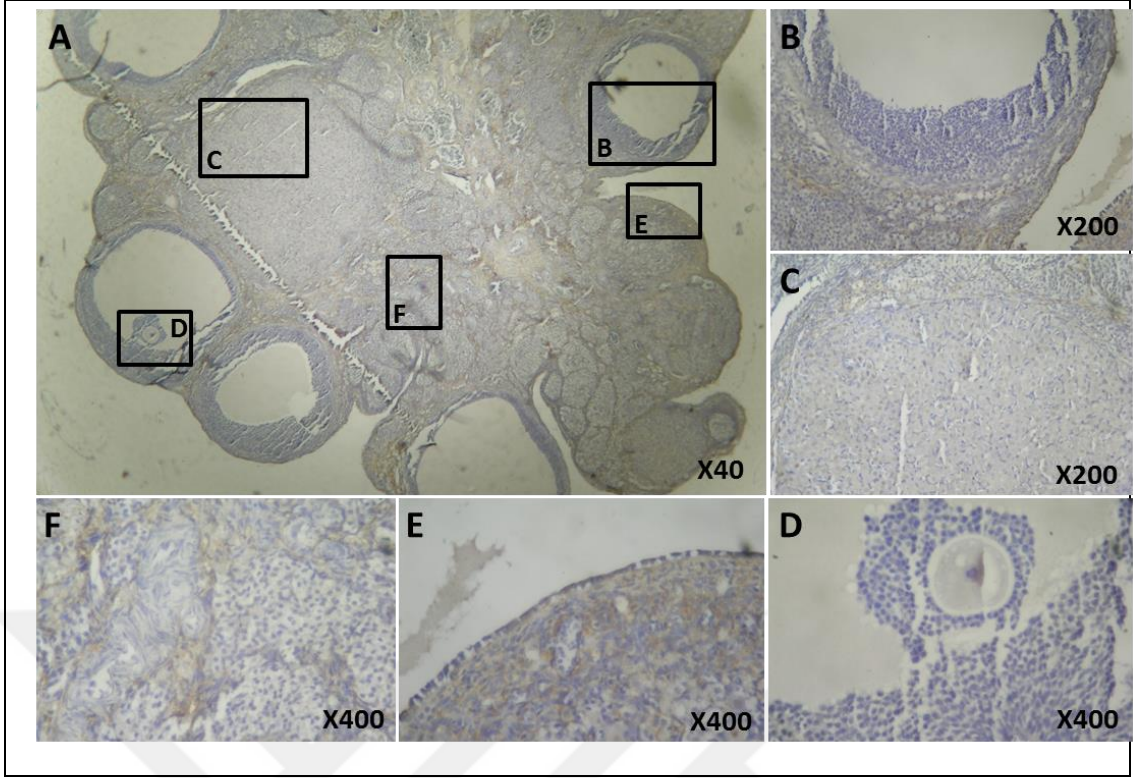
Resim 6.13 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMS örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginea (E) ve medulla (F). Medullada ve germinal epitelde artmış e-NOS boyaması izlendi.

YFMS sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama kesitlerini incelediğimizde foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinde artmış boyanma gözlemlendi ve yeni gelişmekte olan korpus luteum ve çevresindeki parankimde boyanmanın daha fazla olduğu gözlemlendi. Medulla ve germinal epitelde de boyanmanın arttığı izlendi (**Resim 6.14**). YFMS grubun 1.ay ve 2.ay e-NOS için boyama sonuçları karşılaştırıldığında 2.ay kesitlerde korteks elemanları ve medullada e-NOS ekspresyonunun 1.aya göre arttığı tespit edildi.



Resim 6.14 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMS örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

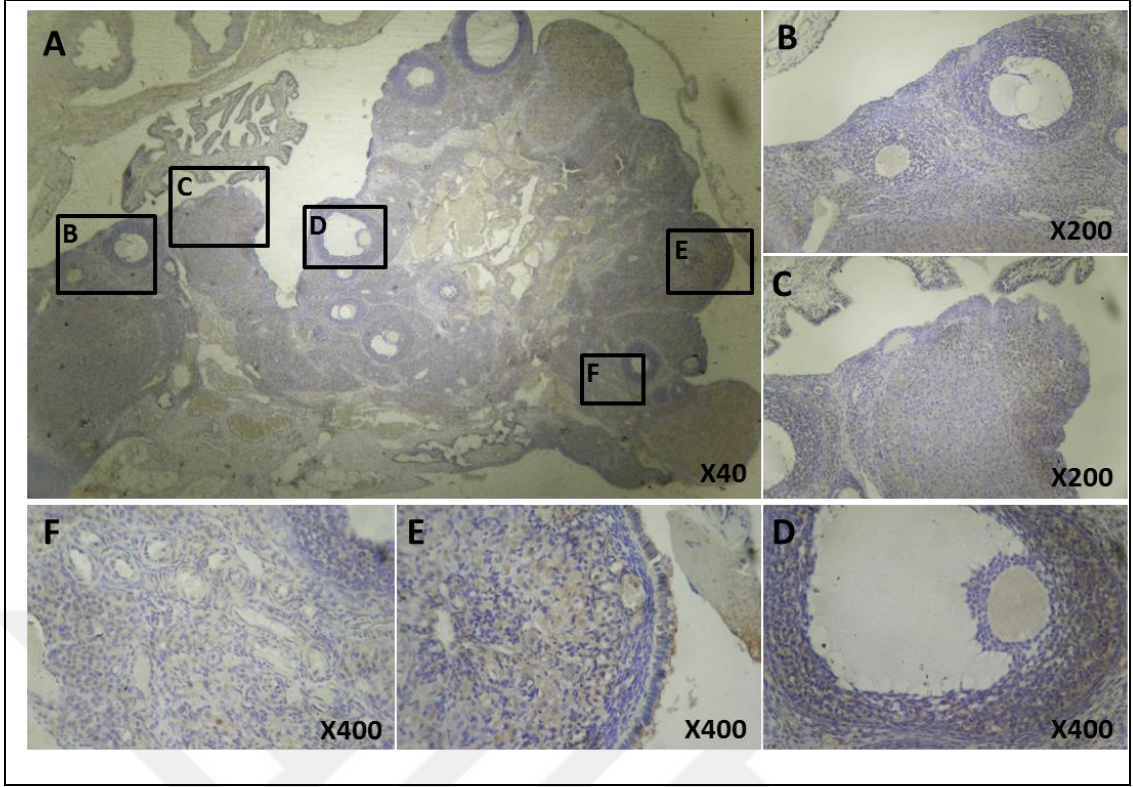
STZ sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama kesitlerini incelediğimizde foliküllerde teka hücrelerinin boyandığını bunun ile beraber korpus luteum ve onun etrafında ki parankimde ve medullada artmış boyanmanın olduğu izlendi. (**Resim 6.15**). Germinal epitelde hafif boyanma izlendi (**Resim 6.15 E**). STZ grubu sıçanların e-NOS için boyama sonrası 1. ve 2. ay sonuçlar benzer olduğundan sadece 2.ay fotoğraflar verildi. STZ grubu e-NOS için immünohistokimya boyamaları YFMS grubu ile karşılaştırıldığında medulla ve germinal epitelde ki boyanmaların daha hafif olduğu tespit edildi.



Resim 6.15 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda STZ örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

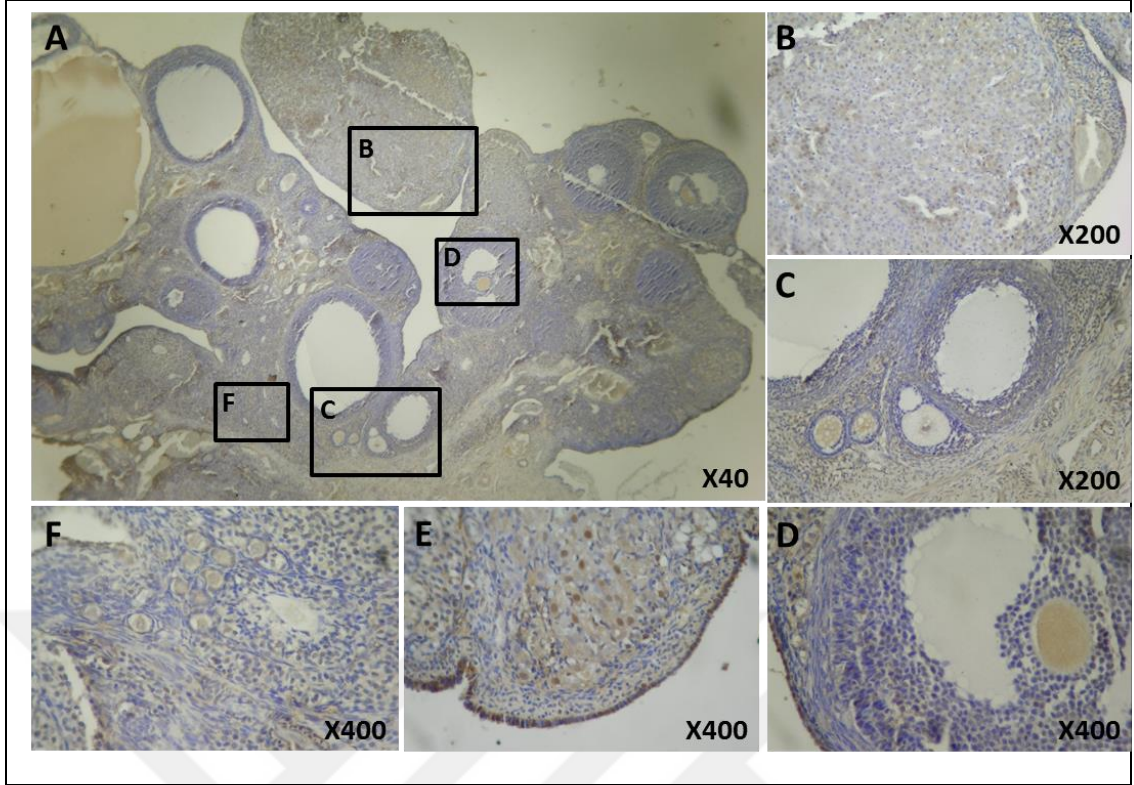
YFMŞ+BY grup sıçanların uygulama sonrası ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YFMŞ grubu ile benzer sonuçlar ortaya çıktığından kesit resimleri verilmedi.

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde granüloza ve teka hücrelerinde boyanma izlendi aynı zamanda korpus luteum ve onun çevresindeki parankimada da boyanma izlendi (**Resim 6.16**). Medulla ve germinal epitelde hafif boyanma izlendi (**Resim 6.16 E,F**). YFMŞ+YDKH grubu 1.ay kesitlerin e-NOS için immünohistokimya boyama sonrası sonuçlar YFMŞ grubu 1.ay sonuçlar ile karşılaştırıldığında YDKH uygulama sonrası medulla ve germinal epiteldeki e-NOS ekspresyon artışının azaldığı saptandı.



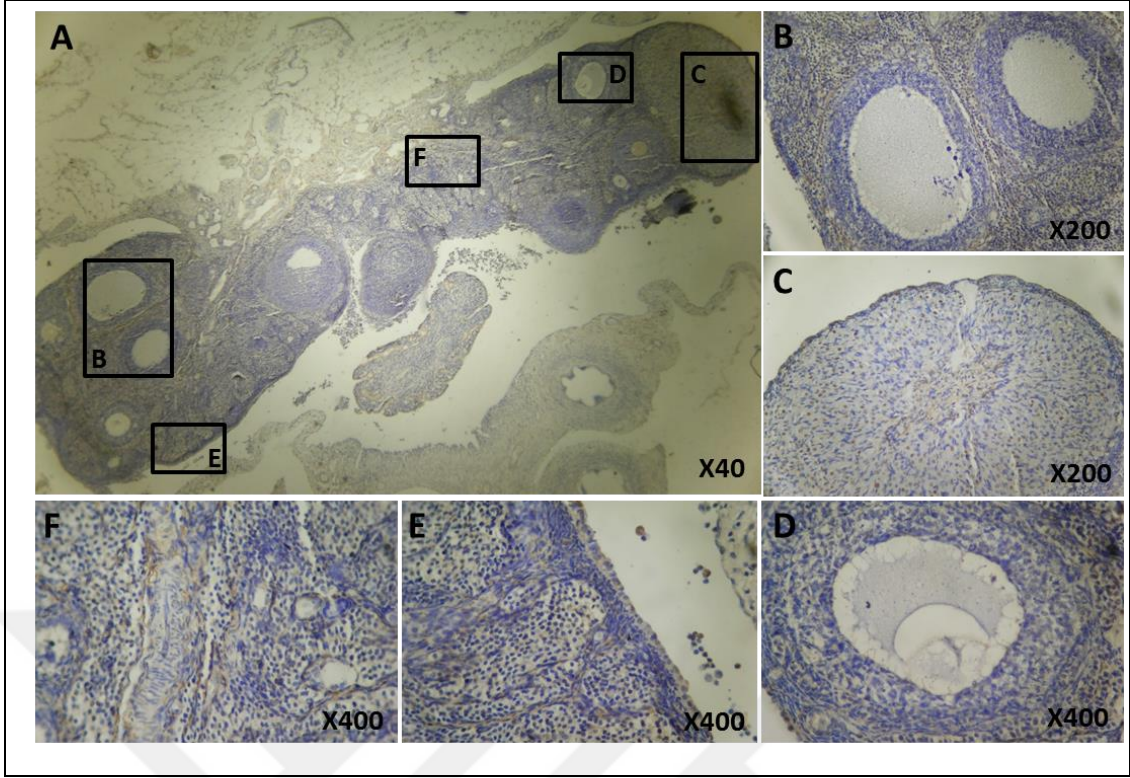
Resim 6.16 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinde pozitif boyama izlendi (**Resim 6.17**). Yeni gelişmekte olan korpus luteumun luteal hücrelerinde belirgin bir e-NOS ekspresyonu gözlemlendi. Medullada çok hafif bir boyanma izlenir iken germinal epitelde daha artmış bir boyama gözlemlendi (**Resim 6.17 E, F**). YFMŞ+YDKH grubu e-NOS için boyama sonrası 1. ve 2.ay kesitler karşılaştırıldığında 2.ay kesitlerde e-NOS ekspresyonun daha da hafiflediği ancak germinal epitelde ekspresyonun çok farklılık göstermediği tespit edildi.



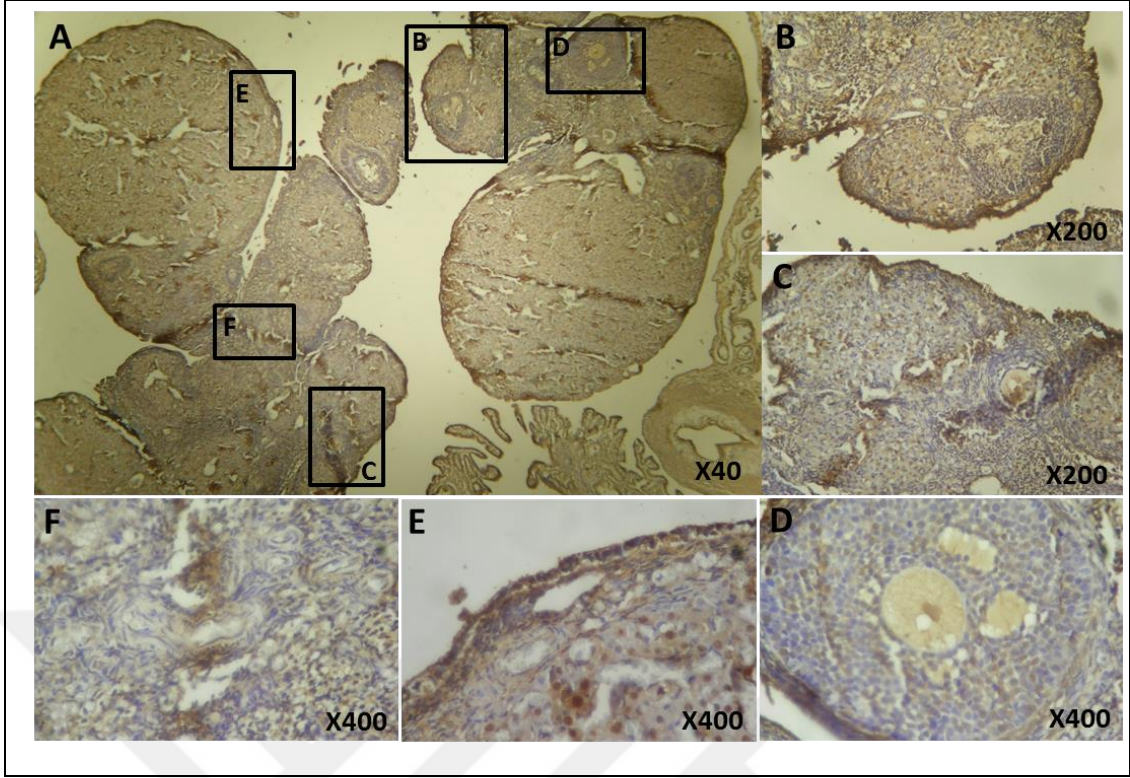
Resim 6.17 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

STZ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinde pozitif boyanma, korpus luteum ve onun çevresindeki parankimde artmış ekspresyon izlendi (**Resim 6.18**). Medulla ve germinal epitelde de hafif boyanma gözlendi (**Resim 6.18 E, F**). STZ+YDKH grubu ve STZ grubu e-NOS için boyama sonrası kesitler karşılaştırıldığında YDKH uygulama sonrası medulla ve germinal epiteldeki e-NOS ekspresyonunun azaldığı görüldü.



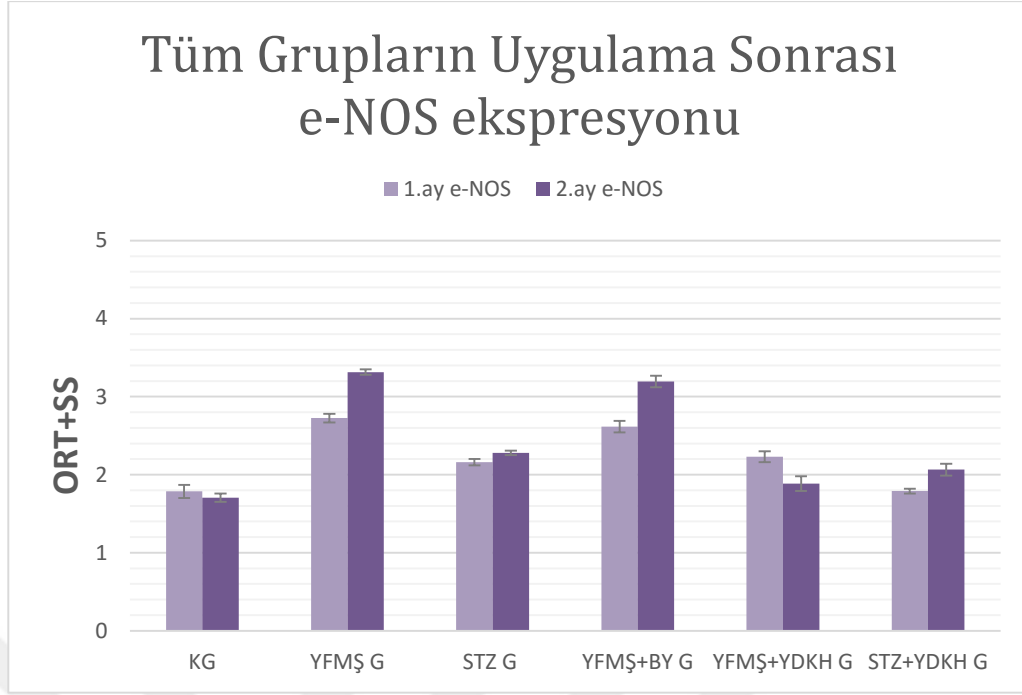
Resim 6.18 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

STZ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen e-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinde, medulla ve germinal epitelde artmış bir e-NOS ekspresyonu izlendi (**Resim 6.19**). STZ+YDKH grubu e-NOS için boyama sonrası 1.ay ve 2.ay kesitler karşılaştırıldığında 2.ayda e-NOS ekspresyonun 1.aya göre hafif bir şekilde arttığı ancak YDKH uygulanmayan STZ grubuna göre ekspresyonun azaldığı izlendi.



Resim 6.19 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde e-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

Oksidatif stres için e-NOS için boyamalar incelenen immünohistokimya görüntülerin skorlama (**Resim 6.20**) ile yapılan morfometrik analizinde YFMŞ ve STZ uygulamasının sıçan over dokularında e-NOS ekspresyonu artırdığı ancak YFMŞ etkisinin daha fazla doluğu ve bu sıçanlara YDKH uygulandığında e-NOS ekspresyonunun azaldığı bulundu. Ancak STZ gruplarına YDKH uygulama sonrası birinci ay daha iyi etki gösterir iken ikinci ayda etkisinin azaldığı saptandı (**Tablo 6.4**).



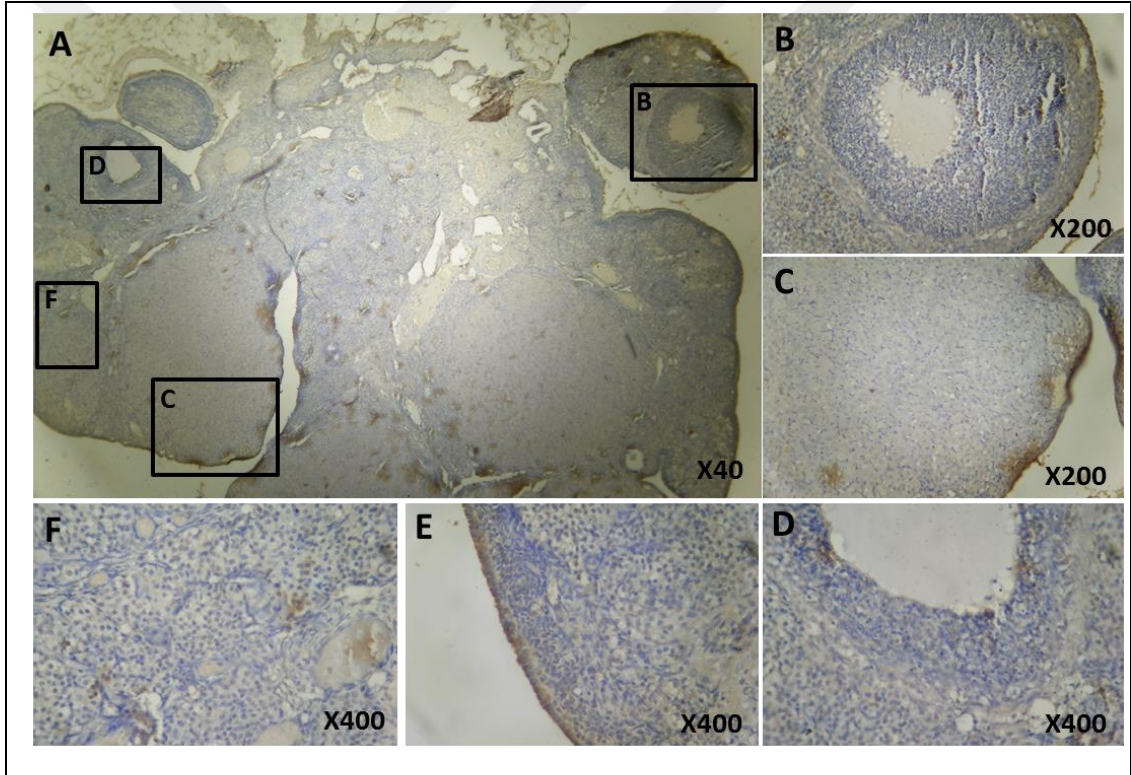
Resim 6.20 YFMŞ ve STZ uygulanma sonrası oksidatif stres için e-NOS boyamaları ile over dokusu üzerindeki etkilerinin morfometrik analizinde tüm örnekler incelendiğinde özellikle YFMŞ grubunda overin oldukça etkilendiğini ve YDKH uygulaması ile birlikte e-NOS ekspresyonunun azaldığı görüldü.

Tablo 6.4 e-NOS boyama sonrası morfometrik analiz istatistik verileri.

Comparison	Difference	q	P value
KG 1.ay eNOS vs YFMŞ 1.ay	-0,7300	24,493	*** P<0,001
KG 1.ay eNOS vs STZ 1.ay	-0,1600	5,368	* P<0,05
KG 1.ay eNOS vs YFMŞ+BY 1.ay	-0,6200	20,802	*** P<0,001
KG 1.ay eNOS vs YFMŞ+YDKH 1.ay	-0,2300	7,717	*** P<0,001
KG 1.ay eNOS vs STZ+YDKH 1.ay	0,2100	7,046	*** P<0,001
KG 1.ay eNOS vs KG 2.ay	0,2900	9,730	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs STZ 1.ay	0,5700	19,124	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+BY 1.ay	0,1100	3,691	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,5000	16,776	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ 2.ay	-0,5900	19,795	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	0,3700	12,414	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ 2.ay	-0,1200	4,026	ns P>0,05
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,3900	13,085	*** P<0,001
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-0,5800	19,460	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	0,4400	14,763	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	0,3400	11,408	*** P<0,001
STZ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,2800	9,394	*** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ 2.ay	-1,610	54,018	*** P<0,001
KG 2.ay vs STZ 2.ay	-0,5700	19,124	*** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-1,490	49,992	*** P<0,001

KG 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-0,1800	6,039	**	P<0,01
KG 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,3600	12,079	***	P<0,001
YFMŞ 2.ay vs STZ 2.ay	1,040	34,894	***	P<0,001
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	0,1200	4,026	ns	P>0,05
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,430	47,979	***	P<0,001
STZ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-0,9200	30,867	***	P<0,001
STZ 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	0,2100	7,046	***	P<0,001
YFMŞ+BY 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,310	43,952	***	P<0,001
YFMŞ+YDKH 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,1800	6,039	**	P<0,01

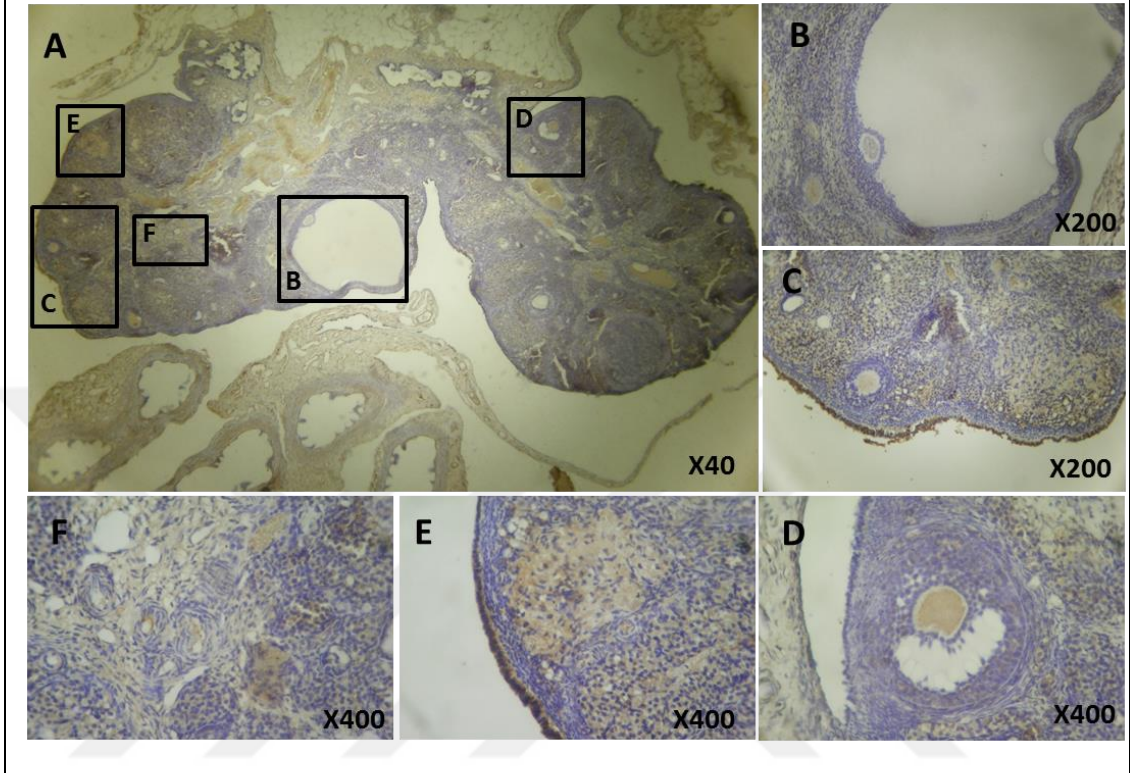
Oksidatif stres için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda i-NOS KG için 1.ay kesitler incelendiğinde e-NOS ile benzer boyama özelliği gösterdiği ancak daha az boyandığı izlendi (**Resim 6.21**). İmmunohistokimyasal boyamalarda i-NOS KG için uygulama sonrası 2.ay sonuçlar 1.ayinkisi ile benzer olduğundan resimler verilmedi.



Resim 6.21 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda KG örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), germinal epitel (E) ve medulla (F).

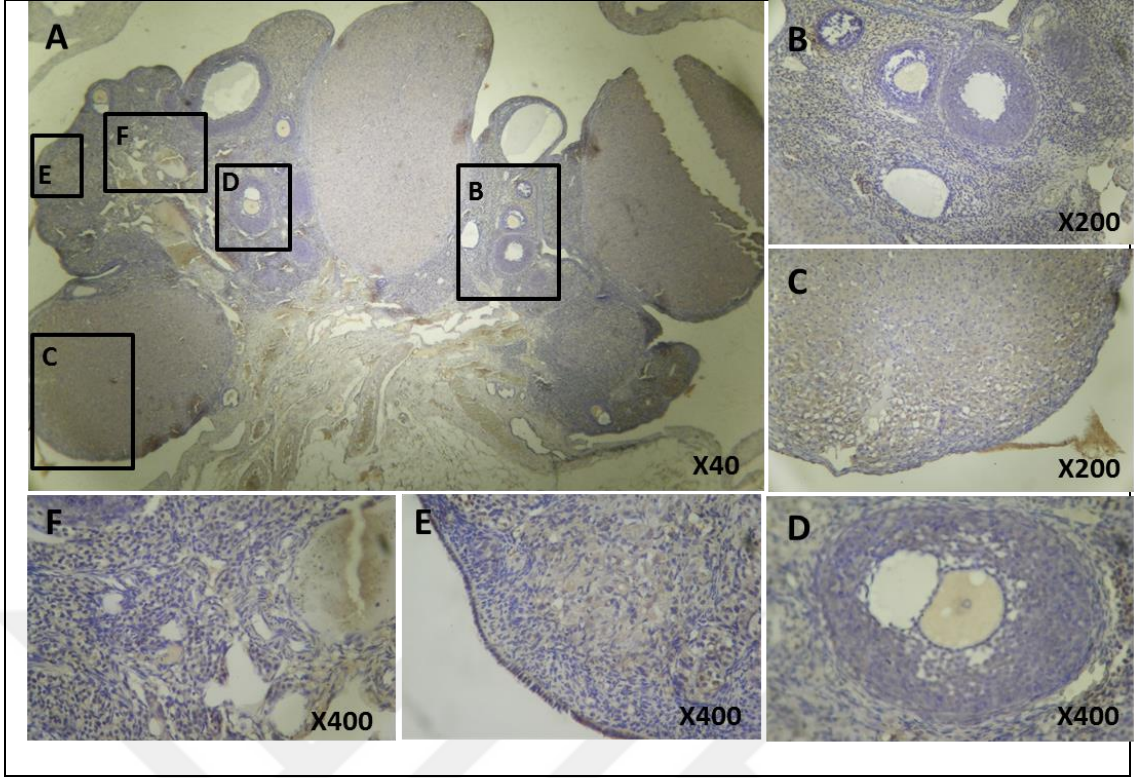
YFMŞ sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovariumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde e-NOS boyamalarına göre granüloza ve teka hücrelerinde artmış bir boyama izlendi (**Resim 6.22**). Medulla ve germinal epitelde de i-NOS ekspresyonunun daha fazla olduğu izlendi (**Resim 6.22 E, F**). YFMŞ grubu i-NOS için immünohistokimya boyamaları KG ile kıyasla daha fazla boyama

gösterdi. Bunun ile beraber e-NOS ekspresyonuna göre artmış bir ekspresyon gösterdiği gözlemlendi.



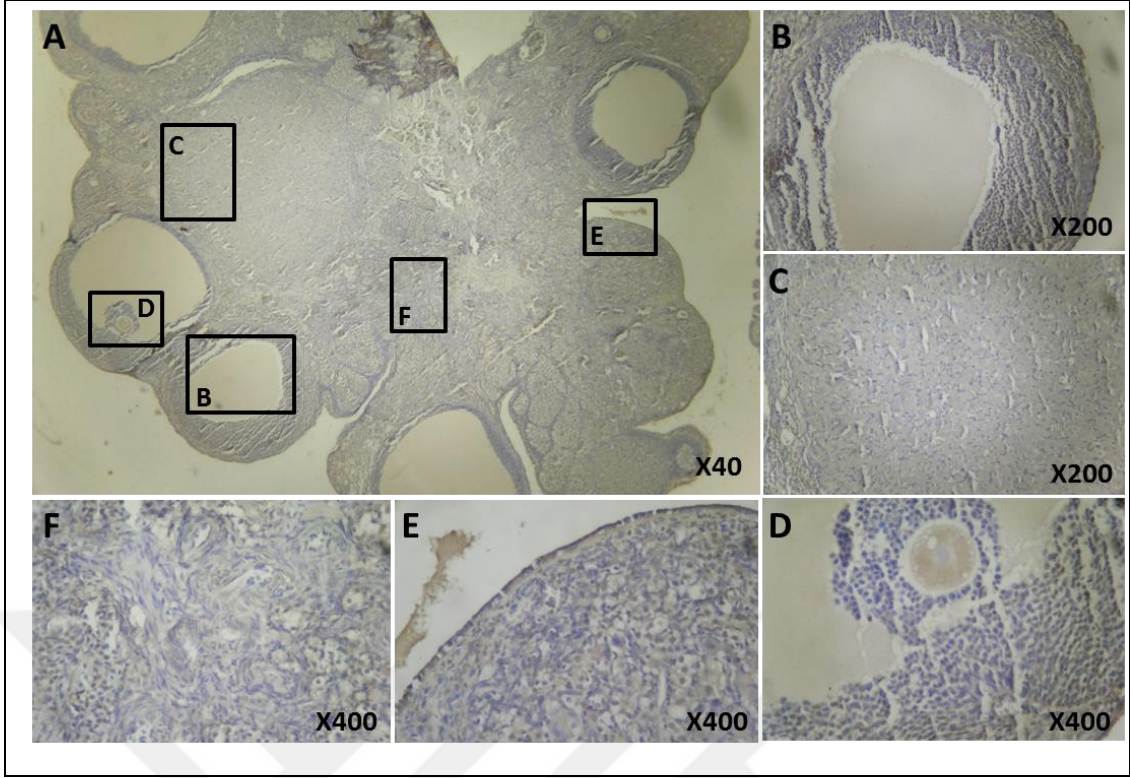
Resim 6.22 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMŞ örneklerinde uygulama sonrası 1. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

YFMŞ grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinin boyama gösterdiği, korpus luteum, medulla ve germinal epitelde de i-NOS pozitif boyanmanın olduğu bulundu (**Resim 6.23**). YFMŞ grubu 1. ve 2.ay i-NOS için boyama sonrası ovaryum kesitlerde genel olarak i-NOS ekspresyonu tespit edildi ve 2.ayda pozitif boyamanın granüloza ve teka hücrelerinde daha çoğunlukla olduğu izlendi.



Resim 6.23 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMS örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

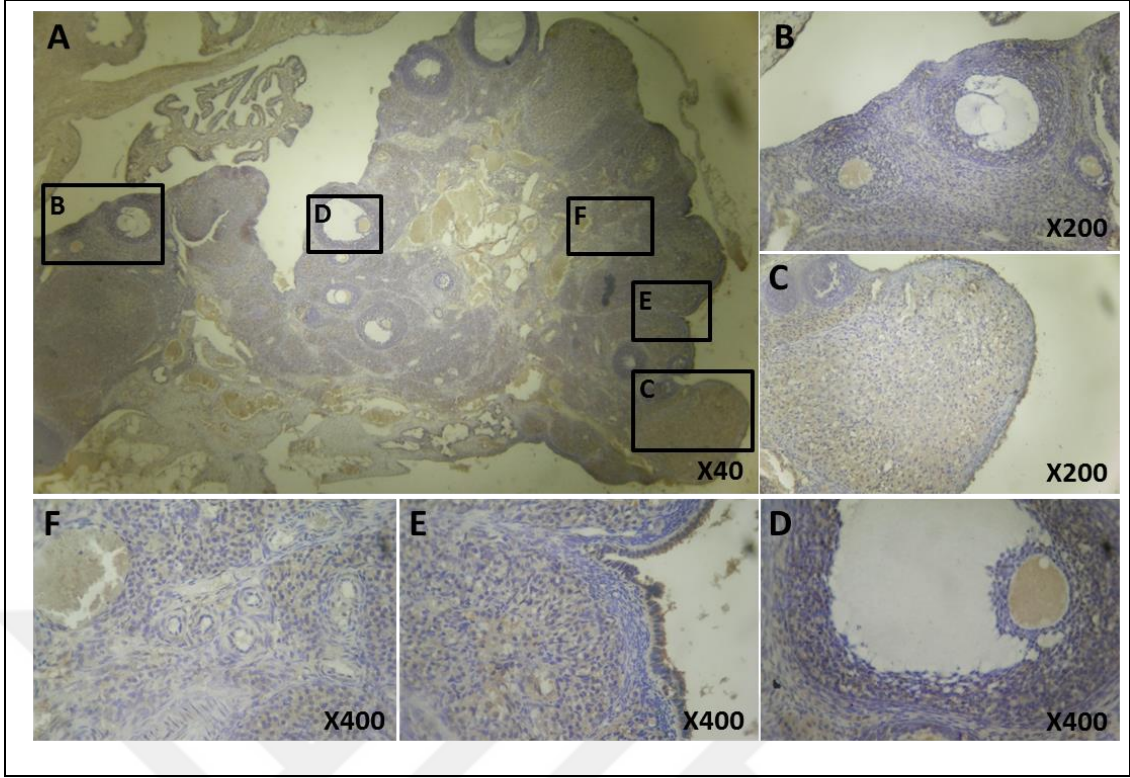
STZ grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde hafif boyanma ancak luteal hücrelerde daha yoğunlukla boyanmanın olduğu izlendi (**Resim 6.24**). Germinal epitel ve medulla da çok az pozitif boyama gözlemlendi (**Resim 6.24 E, F**). STZ grubu sıçanların i-NOS için boyama sonrası 1. ve 2. ay sonuçlar benzer saptandı ve bu neden ile sadece 2.ay fotoğraflar verildi. STZ grubu i-NOS için boyama sonuçları YFMS grubu ile karşılaştırıldığında daha hafif bir i-NOS ekspresyonu saptandı.



Resim 6.24 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda STZ örneklerinde uygulama sonrası 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

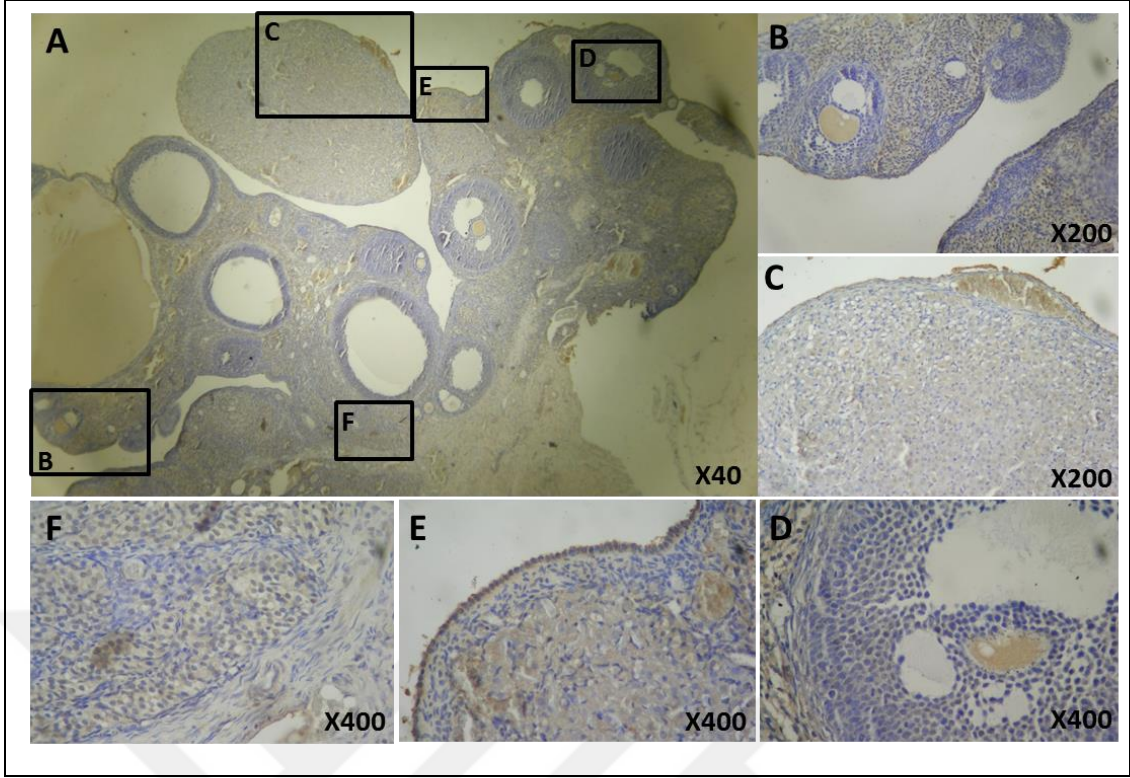
YFMŞ+BY grup sıçanların uygulama sonrası ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YFMŞ grubu ile benzer boyama özelliği gösterdiği izlendi ve bu neden ile resimleri verilmedi.

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YFMŞ+YDKH grubu 1.ay e-NOS boyamaları ile benzer ancak daha fazla boyama gösterdiği bulundu (**Resim 6.25**). İmmünohistokimya incelemelerinde i-NOS için boyama sonrası YFMŞ+YDKH grubu 1.ay kesitleri ile YFMŞ grubu 1.ay kesitleri karşılaştırıldığında YDKH uygulama sonrası i-NOS ekspresyonun granüloza ve teka hücrelerinde azaldığı gözlemlendi.



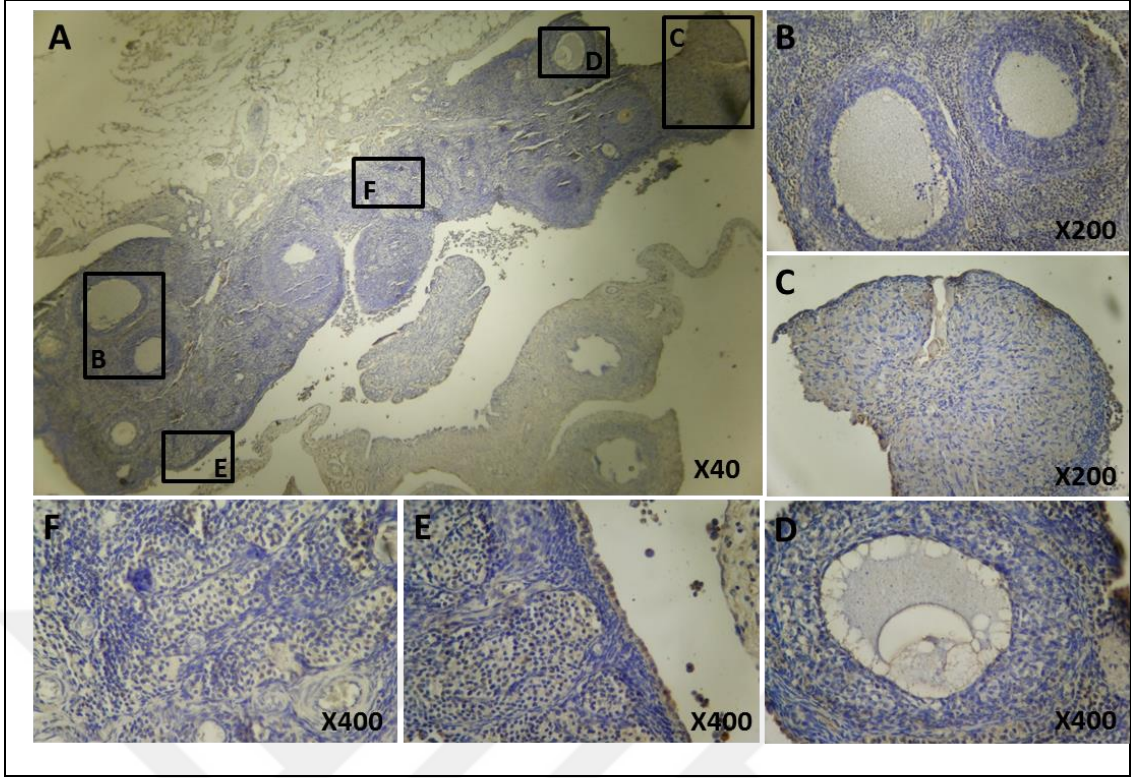
Resim 6.25 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMS+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

YFMS+YDKH sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde granüloza ve teka hücrelerinin hafif i-NOS eksprese ettiği gözlemlendi bunun ile beraber luteal hücreler ve germinal epitelde de pozitif boyama bulundu (**Resim 6.26**). YDKH uygulama sonrası YFMS ile beslenen sıçanların over dokularında i-NOS ekspresyonunun azaldığı tespit edildi.



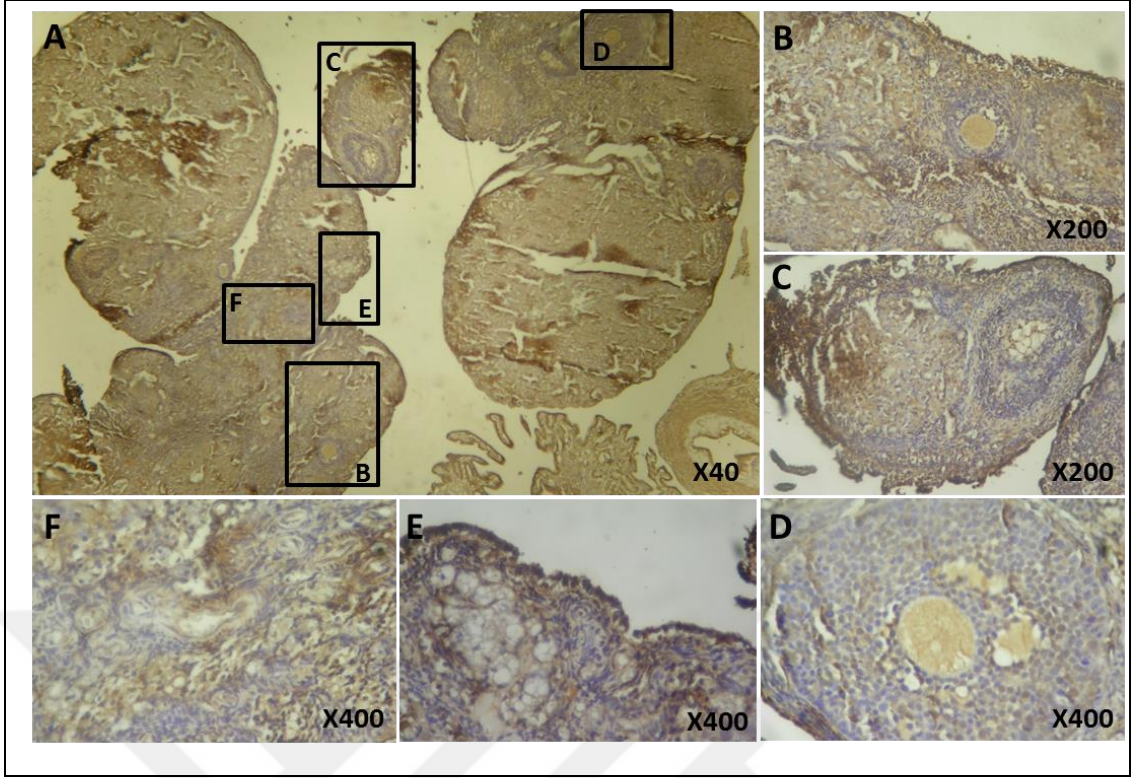
Resim 6.26 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda YFMS+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

STZ+YDKH sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YDKH uygulanmayan STZ grubu i-NOS boyamaları ile benzer boyanma özelliği gösterdiği bulundu (**Resim 6.27**).



Resim 6.27 oksidatif stress durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

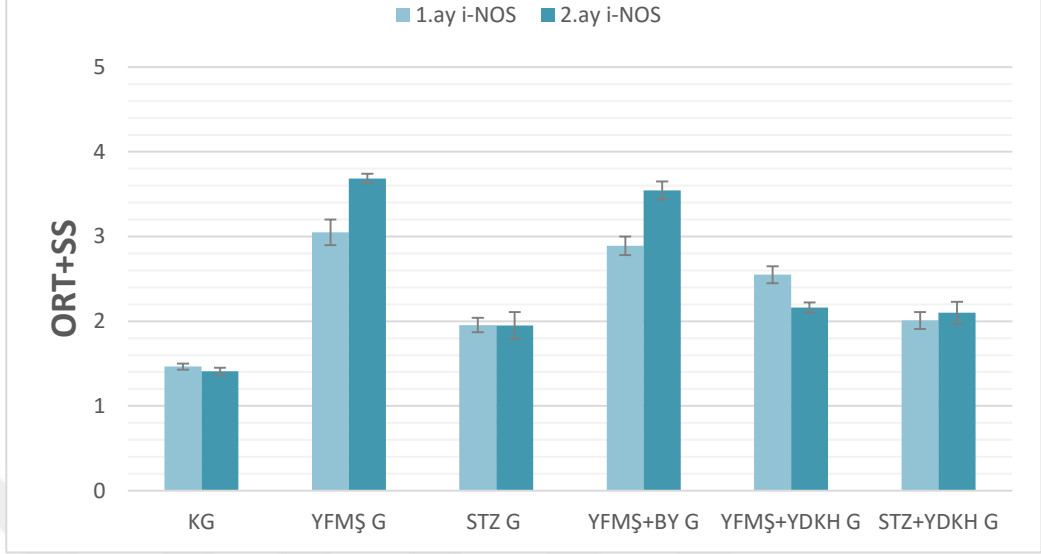
STZ+YDKH sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen i-NOS için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde STZ grubu ve STZ+YDKH grubu i-NOS boyamaları ile bezer özellik gösterdi (**Resim 6.28**). STZ uygulanan gruplarda i-NOS ekspresyonu YFMŞ grubuna göre daha az olarak saptandı. STZ uygulanan gruplarda YDKH uygulaması sonrası i-NOS ekspresyonunda belirgin bir fark gözlemlenmedi.



Resim 6.28 oksidatif stres durumunun belirlenmesinde i-NOS için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde uygulama sonrası 2. Ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

Oksidatif stres için i-NOS için boyamalar incelenen immünohistokimya görüntülerin skorlama (**Resim 6.29**) ile yapılan morfometrik analizinde YFMSŞ uygulamasının sıçan over dokularında i-NOS ekspresyonu artırdığı ancak STZ uygulamasının i-NOS üzerinde daha hafif bir etkisinin olduğu bulundu. YFMSŞ grubuna YDKH uygulama sonrası i-NOS ekspresyonunun azaldığı saptandı. Ancak STZ gruplarında i-NOS ekspresyonunun kontrole göre belirgin bir fark göstermediği aynı zamanda YDKH uygulama sonrası i-NOS ekspresyonunda da anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi (**Tablo 6.5**).

Tüm Grupların Uygulama Sonrası i-NOS ekspresyonu



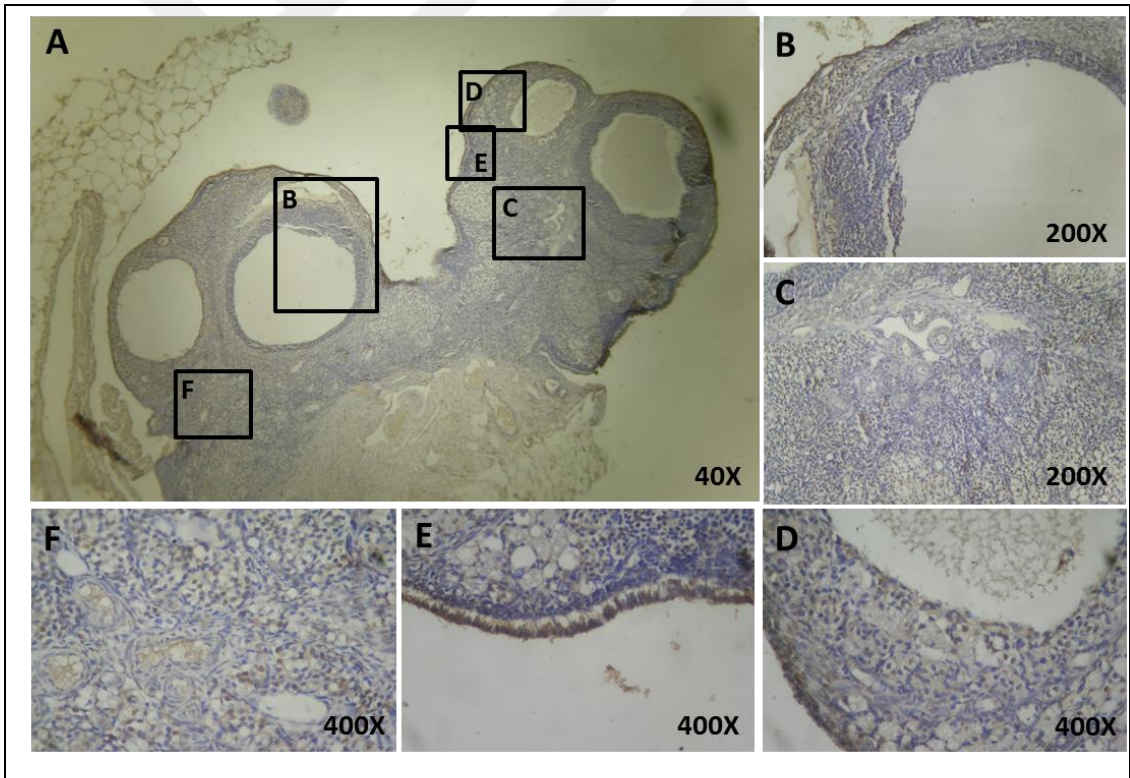
Resim 6.29 Uygulama sonrası tüm grupların i-NOS ekspresyonu incelendiği morfometrik analizinde özellikle YFMŞ grubunda overin oldukça etkilendiğini ve YDKH uygulaması ile birlikte i-NOS ekspresyonunun azaldığı görüldü. STZ uygulanmasının tüm gruplarda i-NOS üzerine etkisinin hafif olduğu saptandı.

Tablo 6.5 i-NOS boyama sonrası morfometrik analiz istatistik verileri.

Comparison	Difference	q	P value
KG 1.ay iNOS vs YFMŞ 1.ay	-2,050	44,436	*** P<0,001
KG 1.ay iNOS vs STZ 1.ay	-0,9600	20,809	*** P<0,001
KG 1.ay iNOS vs YFMŞ+BY 1.ay	-1,890	40,968	*** P<0,001
KG 1.ay iNOS vs YFMŞ+YDKH 1.ay	-1,550	33,598	*** P<0,001
KG 1.ay iNOS vs STZ+YDKH 1.ay	-1,010	21,893	*** P<0,001
KG 1.ay iNOS vs KG 2.ay	-0,4100	8,887	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs STZ 1.ay	1,090	23,627	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+BY 1.ay	0,1600	3,468	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,5000	10,838	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ 2.ay	-0,6400	13,873	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	-0,05000	1,084	ns P>0,05
STZ 1.ay vs STZ 2.ay	0,010000	0,2168	ns P>0,05
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,3400	7,370	*** P<0,001
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-0,6600	14,306	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	0,5400	11,705	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	0,3900	8,454	*** P<0,001
STZ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,09000	1,951	ns P>0,05
KG 2.ay vs YFMŞ 2.ay	-2,280	49,421	*** P<0,001
KG 2.ay vs STZ 2.ay	-0,5400	11,705	*** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-2,140	46,387	*** P<0,001

KG 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-0,7500 16,257 *** P<0,001
KG 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,6900 14,956 *** P<0,001
YFMŞ 2.ay vs STZ 2.ay	1,740 37,716 *** P<0,001
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	0,1400 3,035 ns P>0,05
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,530 33,164 *** P<0,001
STZ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-1,600 34,682 *** P<0,001
STZ 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,1500 3,251 ns P>0,05
YFMŞ+BY 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,390 30,130 *** P<0,001
YFMŞ+YDKH 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	0,06000 1,301 ns P>0,05

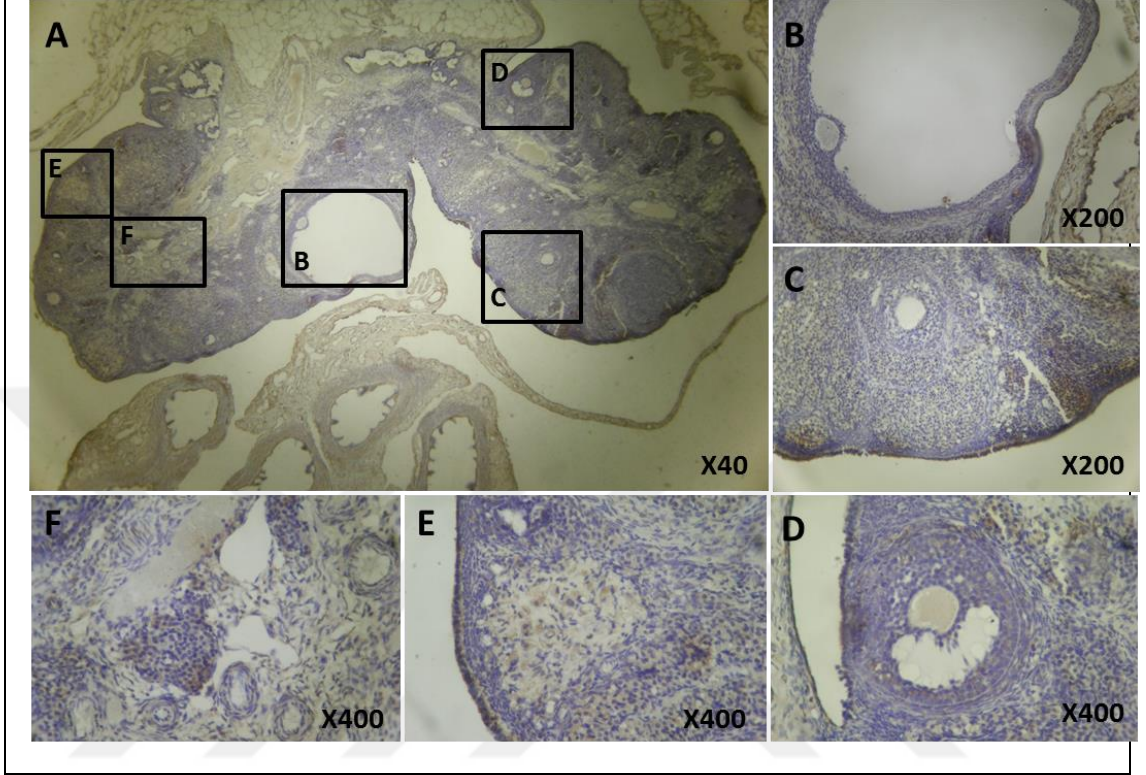
Damarlanma düzeyini belirlemek için VEGF için immünohistokimya boyamalarda KG için 1. ay kesitlerde VEGF pozitif hücrelerin medullada damar epitelinde, yeni gelişmekte olan korpus luteum ve onun çevresindeki parankimde, foliküllerde granüloza hücrelerinde de mevcut olduğu görüldü (**Resim 6.30**). İmmünohistokimyasal boyamalarda VEGF KG için uygulama sonrası 2.ay sonuçlar 1.ayinki ile benzer bulundu ve sadece 1.ay resimleri verildi.



Resim 6.30 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda KG örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), germinal epitel ve tunika albuginya (E) ve medulla (C, F).

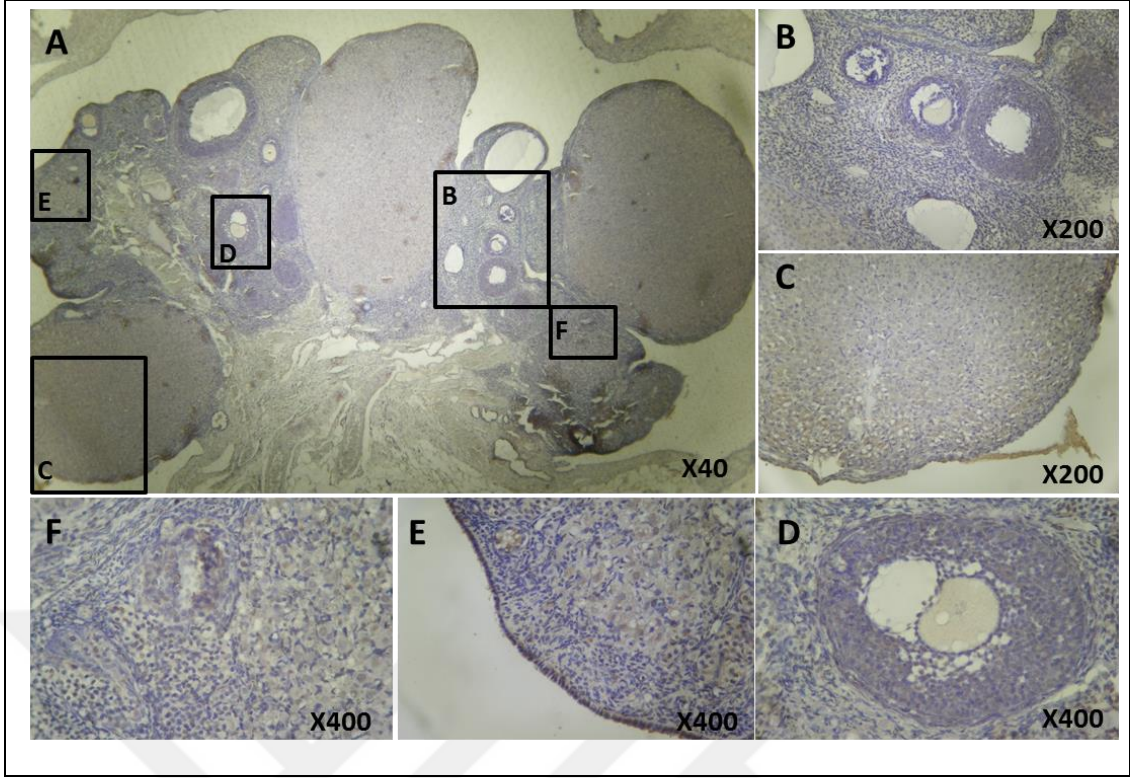
YFMŞ grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde gelişmiş foliküllerde, korpus luteum ve onun etrafındaki parankimde ve medullada VEGF eksprese eden hücreler

bulundu (**Resim 6.31**). YFMŞ grubu 1.ay ovaryum kesitleri VEGF için boyama sonrası sonuçlar KG ile karşılaştırıldığında VEGF pozitif hücrelerin arttığı görüldü.



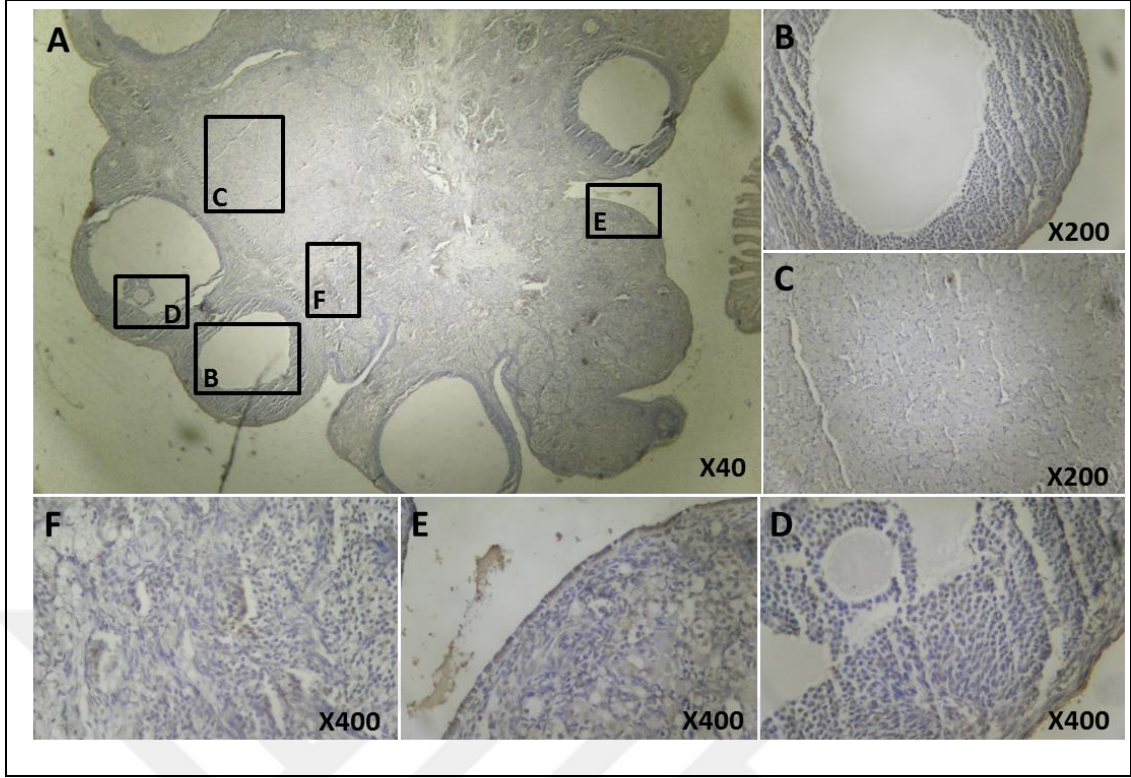
Resim 6.31 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMŞ örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

YFMŞ grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde 1.ay boyamalar ile benzer ancak azalmış bir boyama izlendi (**Resim 6.32**). YFMŞ grubu 1. ve 2. ay VEGF için boyama sonuçlar karşılaştırıldığında VEGF ekspresyonunun 1.ayda daha fazla olduğu izlendi. Ancak YFMŞ 2. ay kontrol grubuna göre artmış bir VEGF ekspresyonu görüldü.



Resim 6.32 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMS örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

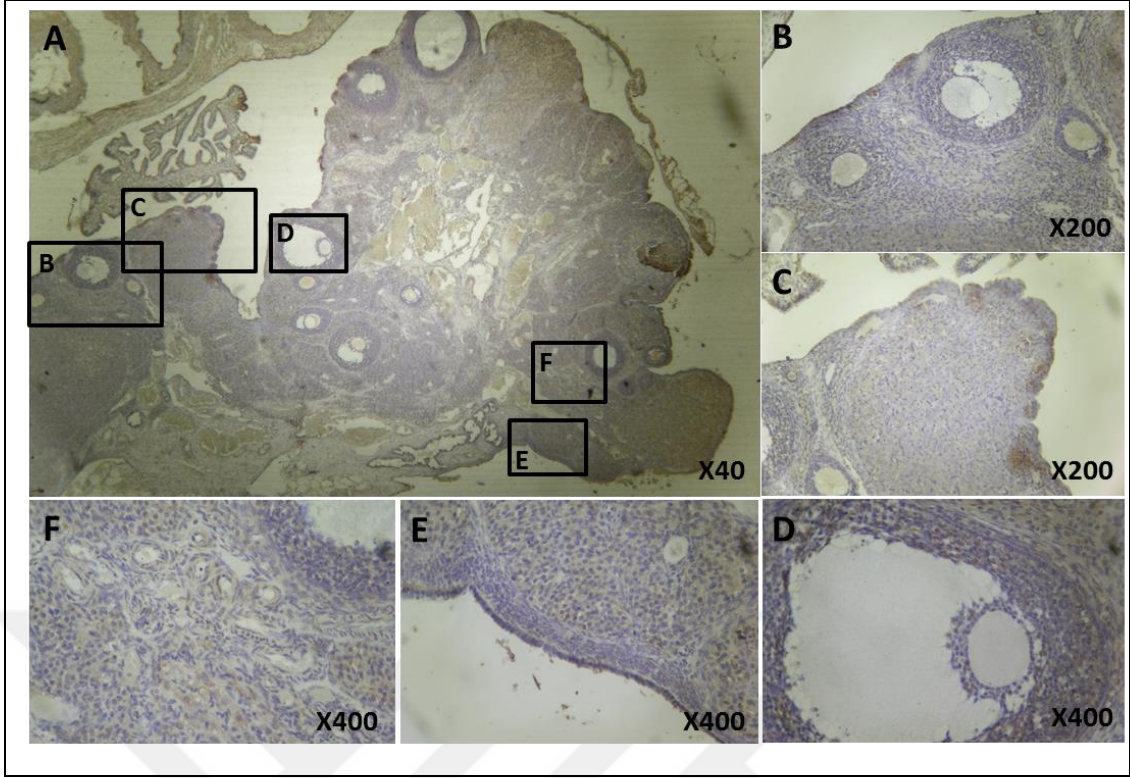
STZ grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde granüloza hücreleri ve germinal epitel hücrelerinde az sayıda pozitif boyama olduğu, luteal hücrelerde ise daha fazla pozitif boyama olduğu bulundu (**Resim 6.33**). STZ grubu sıçanların VEGF için boyama sonrası 1. ve 2. ay sonuçlar benzerlik gösterdi ve sadece 2. ay fotoğraflar verildi. STZ grubu damarlanma durumunun belirlenmesi için VEGF boyama sonuçları YFMS grubu ile karşılaştırıldığında daha az pozitif boyama izlendi. Ancak kontrol gruba göre VEGF ekspresyonunun daha fazla olduğu görüldü.



Resim 6.33 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda STZ örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

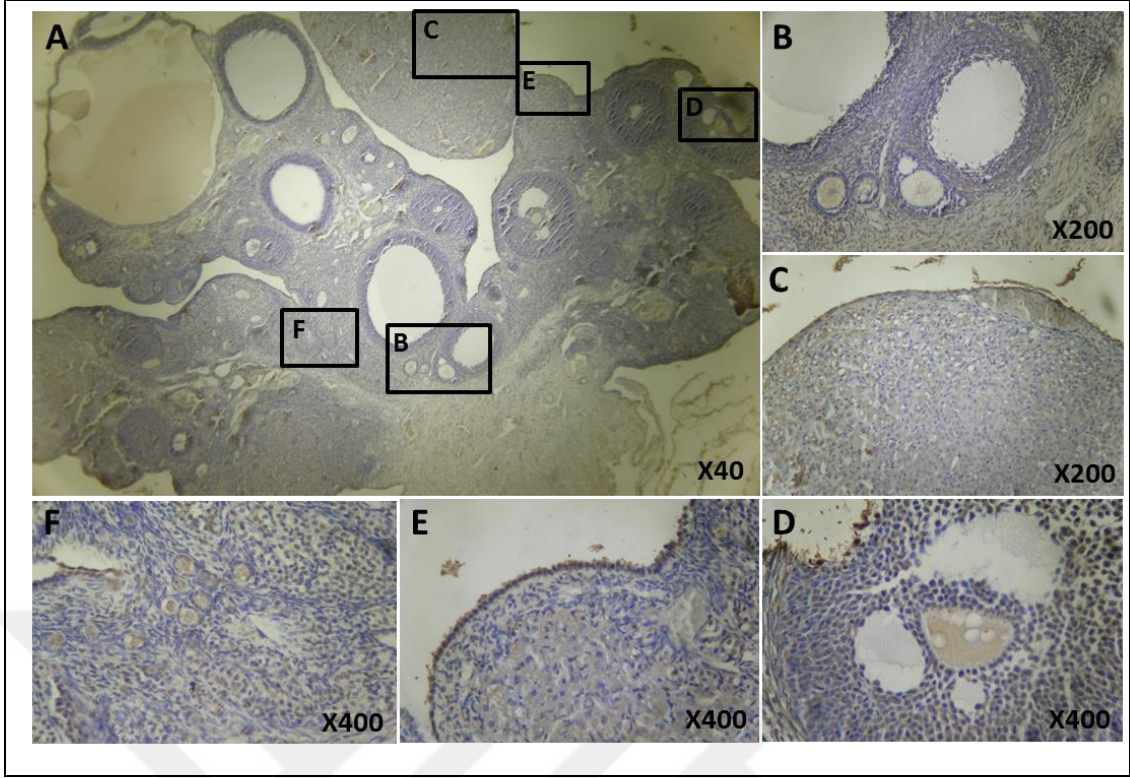
YFMŞ+BY grup sıçanların uygulama sonrası ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YFMŞ grubu ile benzer sonuçlar ortaya çıktı dolayısı ile kesit resimleri verilmedi.

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde pozitif boyanmanın YFMŞ grubu ile benzer ancak daha az boyanma özelliği gösterdiği bulundu (**Resim 6.34**).



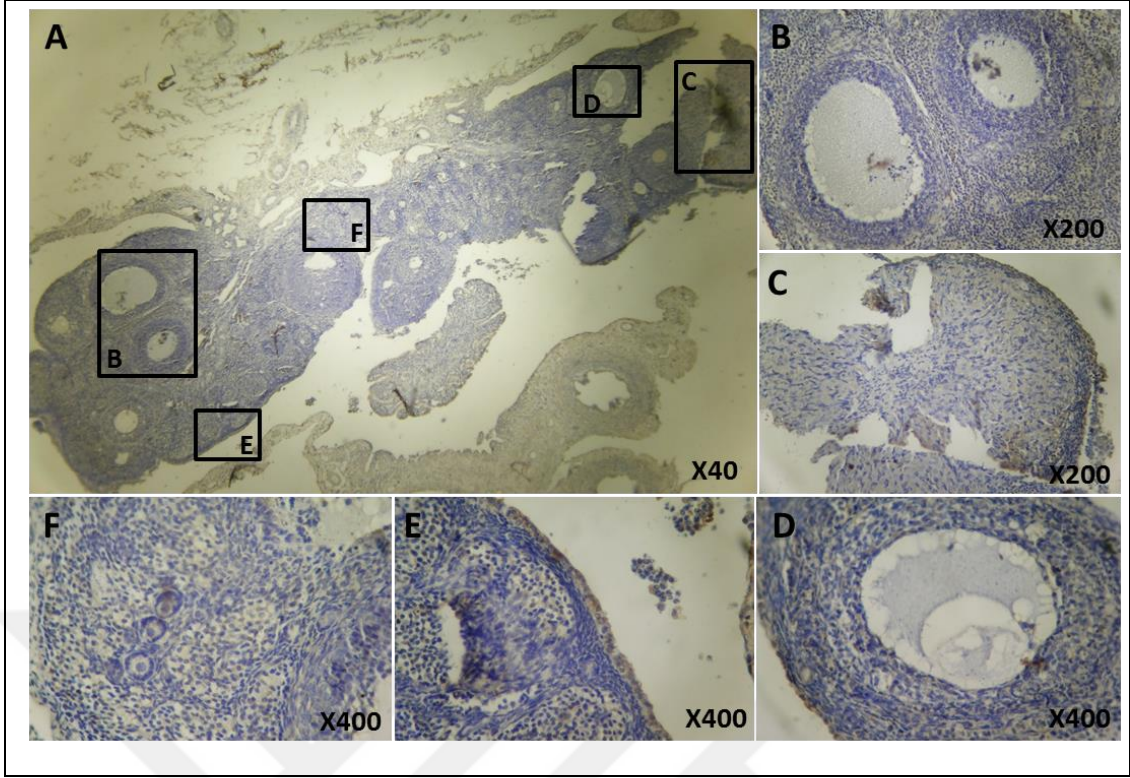
Resim 6.34 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMŞ+YDKH örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde granülza ve luteal hücreler, medullada damar epitel ve germinal epitelde VEGF ekspresyonu saptandı (**Resim 6.35**). YFMŞ+YDKH grubu ile YDKH uygulanmayan YFMŞ grubu VEGF için boyama sonrası 2.ay kesitler karşılaştırıldığında pozitif boyamının YDKH uygulama sonrası azaldığı bulundu.



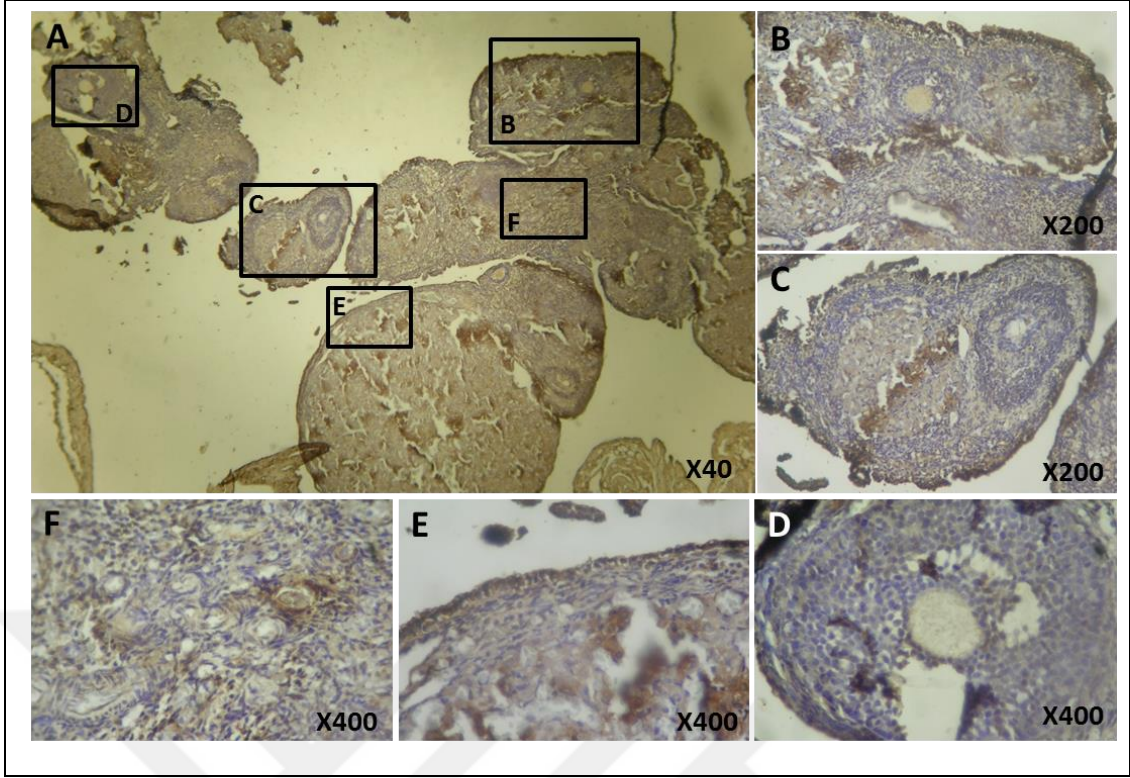
Resim 6.35 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda YFMS+YDKH örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

STZ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde STZ grubu ile benzer boyanma özelliği gösterdiği bulundu (**Resim 6.36**).



Resim 6.36 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

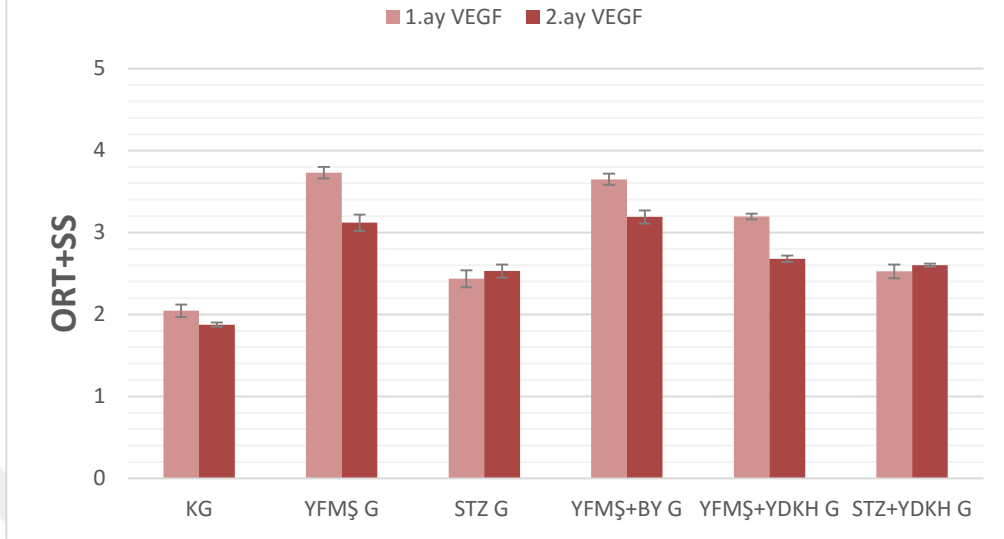
STZ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen VEGF için boyama sonrası kesitleri incelediğimizde 1.ay kesitlere benzer ancak artmış VEGF ekspresyonu görüldü (**Resim 6.37**).



Resim 6.37 Damarlanma durumunun belirlenmesinde VEGF için boyamalarda STZ+YDKH örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

Damarlanma durumu için VEGF için boyamalar incelenen immünohistokimya görüntülerin skorlama (**Resim 6.38**) ile yapılan morfometrik analizinde YFMSŞ uygulamasının sıçan over dokularında VEGF ekspresyonu artırdığı ancak STZ uygulamasının VEGF üzerinde daha hafif bir etkisinin olduğu bulundu. YFMSŞ grubuna YDKH uygulama sonrası VEGF ekspresyonunun azaldığı saptandı. Ancak STZ gruplarında VEGF ekspresyonunun kontrole göre daha az fark gösterdiği aynı zamanda YDKH uygulama sonrası VEGF ekspresyonunda da anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi (**Tablo 6.6**).

Tüm Grupların Uygulama Sonrası VEGF ekspresyonu



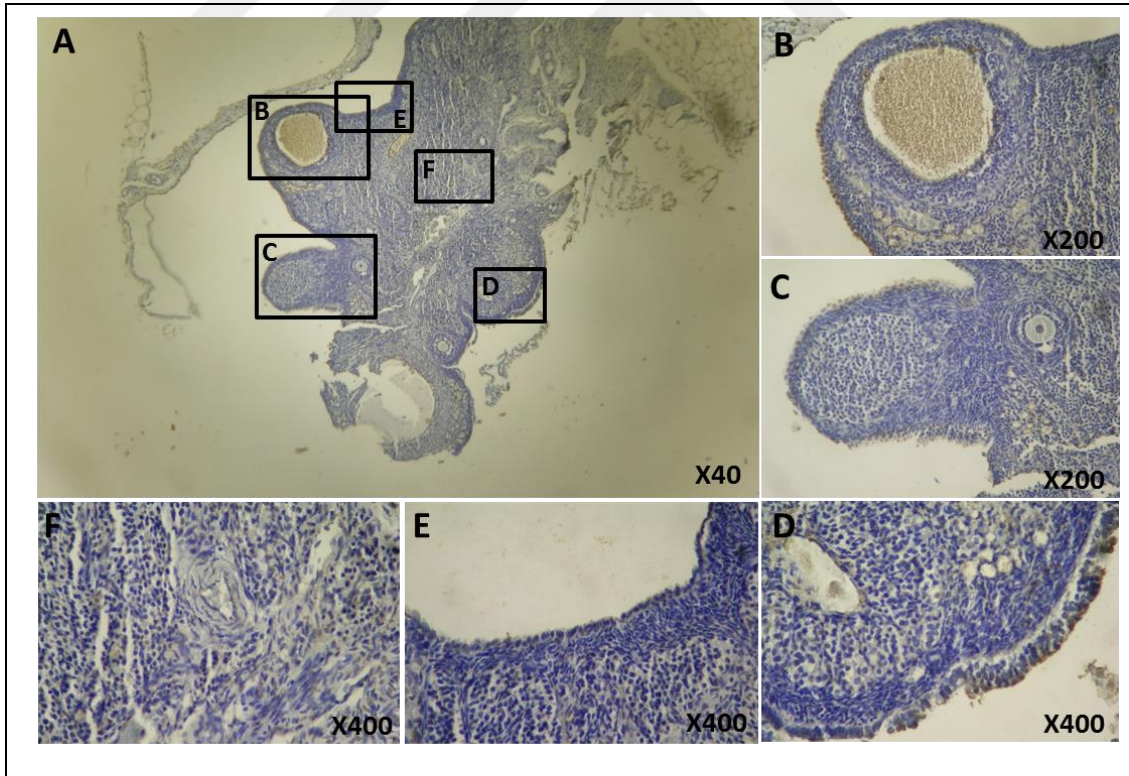
Resim 6.38 Uygulama sonrası tüm grupların VEGF ekspresyonu incelendiği morfolometrik analizinde özellikle YFMŞ grubunda VEGF ekspresyonunun arttığı ve YDKH uygulaması ile birlikte ekspresyonun azaldığı görüldü. STZ uygulanmasının tüm gruplarda VEGF üzerine etkisinin daha az olduğu saptandı.

Tablo 6.6 VEGF boyama sonrası morfolometrik analiz istatistik verileri.

Comparison	Difference	q	P value
KG 1.ay VEGF vs YFMŞ 1.ay	-1,730	53,602	*** P<0,001
KG 1.ay VEGF vs STZ 1.ay	-0,4400	13,633	*** P<0,001
KG 1.ay VEGF vs YFMŞ+BY 1.ay	-1,650	51,123	*** P<0,001
KG 1.ay VEGF vs YFMŞ+YDKH 1.ay	-1,200	37,181	*** P<0,001
KG 1.ay VEGF vs STZ+YDKH 1.ay	-0,5300	16,421	*** P<0,001
KG 1.ay VEGF vs KG 2.ay	0,1200	3,718	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs STZ 1.ay	1,290	39,969	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+BY 1.ay	0,08000	2,479	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,5300	16,421	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ 2.ay	0,6100	18,900	*** P<0,001
STZ 1.ay vs YFMŞ+BY 1.ay	-1,210	37,490	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	-0,09000	2,789	ns P>0,05
STZ 1.ay vs STZ 2.ay	-0,09000	2,789	ns P>0,05
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,4500	13,943	*** P<0,001
YFMŞ+BY 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	1,120	34,702	*** P<0,001
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	0,4600	14,253	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	0,6700	20,759	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	0,5200	16,112	*** P<0,001
STZ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,07000	2,169	ns P>0,05

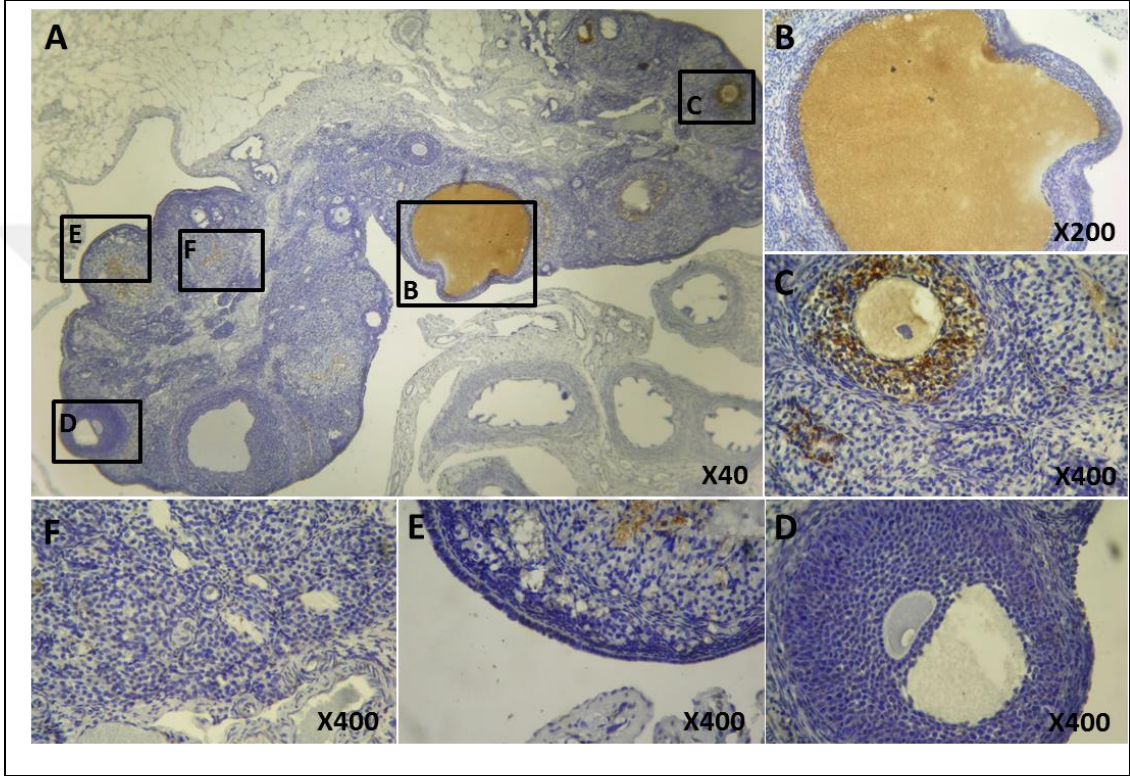
KG 2.ay vs YFMŞ 2.ay	-1,240 38,420 *** P<0,001
KG 2.ay vs STZ 2.ay	-0,6500 20,140 *** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-1,310 40,589 *** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-0,8000 24,787 *** P<0,001
KG 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,7200 22,308 *** P<0,001
YFMŞ 2.ay vs STZ 2.ay	0,5900 18,280 *** P<0,001
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-0,07000 2,169 ns P>0,05
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	0,4400 13,633 *** P<0,001
STZ 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,07000 2,169 ns P>0,05
YFMŞ+BY 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	0,5100 15,802 *** P<0,001
YFMŞ+YDKH 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	0,08000 2,479 ns P>0,05

Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında KG için 1. ay kesitlerde genel olarak gelişmiş foliküllerde, korpus luteum ve etrafındaki parankimde az sayıda TUNEL pozitif hücreler saptandı (**Resim 6.39**). Germinal epitel ve medullada pozitif hücre bulunmadı (**Resim 6.39 E**). İmmunohistokimyasal TUNEL boyamalarında KG için uygulama sonrası 2.ay sonuçlar 1.ayinki ile benzer olarak bulundu ve sadece 1.ay resimleri verildi.



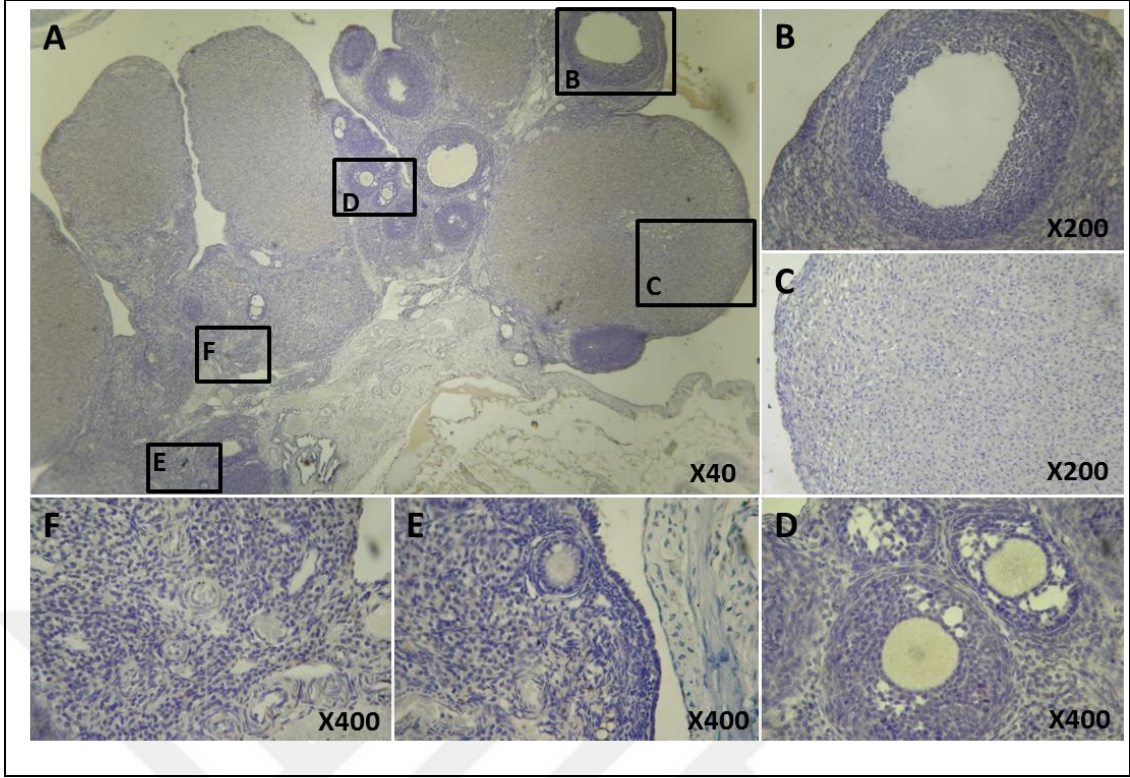
Resim 6.39 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında KG örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F). Gelişmiş folikülde ve korpus luteumda az sayıda pozitif boyama görüldü.

YFMSŞ grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde gelişmiş folikül ve bazı sekonder foliküllerde pozitif boyama izlendi (**Resim 6.40 B, C**). Germinal epitel ve medullada da az sayıda TUNEL pozitif hücreler bulundu (**Resim 6.40 E, F**). YFMSŞ grubu TUNEL immünohistokimya boyamalarında 1.ay kesitler KG ile karşılaştırıldığında apoptotik hücrelerin arttığı görüldü.



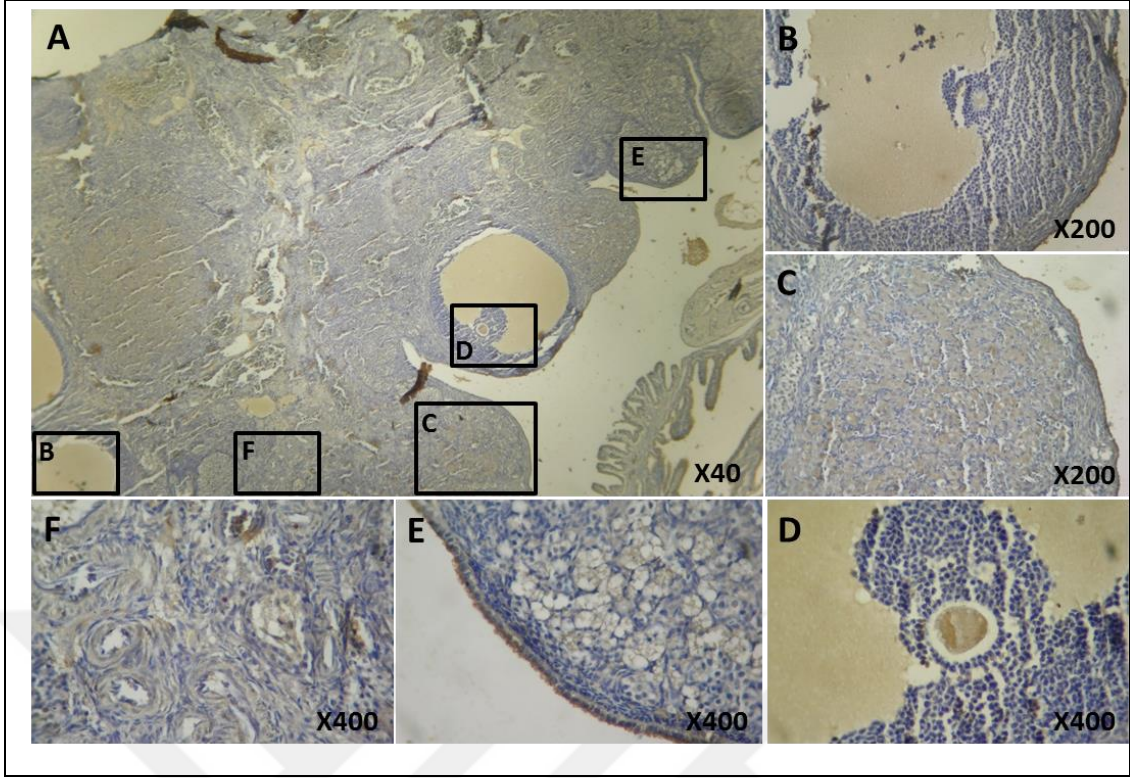
Resim 6.40 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMSŞ grubu örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, C, D), tunika albuginea (E) ve medulla (F). Bazı sekonder ve graf foliküllerde, germinal epitel ve medullada TUNEL pozitif hücreler izlendi.

YFMSŞ grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde 1.ay kesitler ile benzer ancak medulla ve germinal epitelde artmış TUNEL pozitif ekspresyonu bulundu (**Resim 6.41**).



Resim 6.41 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMSŞ grubu örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

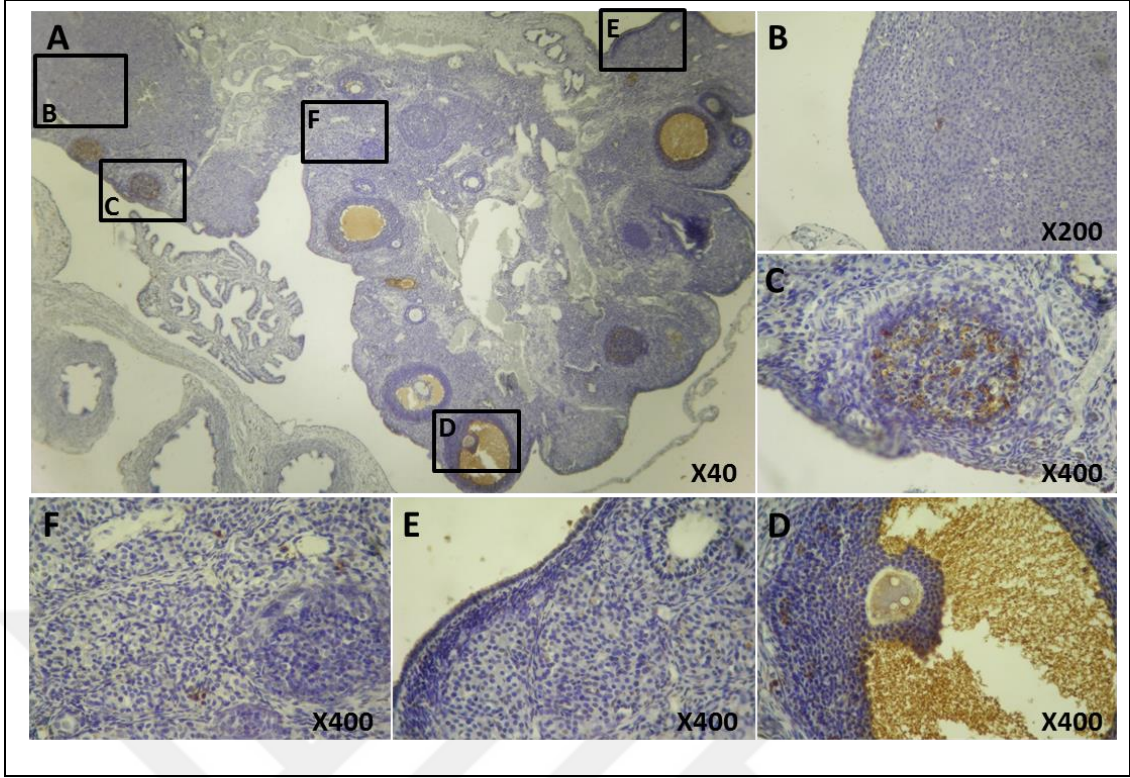
STZ grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde genel olarak TUNEL pozitif ekspresyonun arttığı gözlemlendi (**Resim 6.42**). STZ grubu sıçanların TUNEL boyama sonrası 1. ve 2. ay sonuçları benzer olduğundan sadece 2.ay fotoğrafları verildi. İmmünohistokimyasal TUNEL boyaması için STZ grubu kesitler YFMSŞ grubu kesitler karşılaştırıldığında STZ grubunda apoptotik hücrelerin daha fazla olduğu görüldü.



Resim 6.42 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında STZ grubu örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

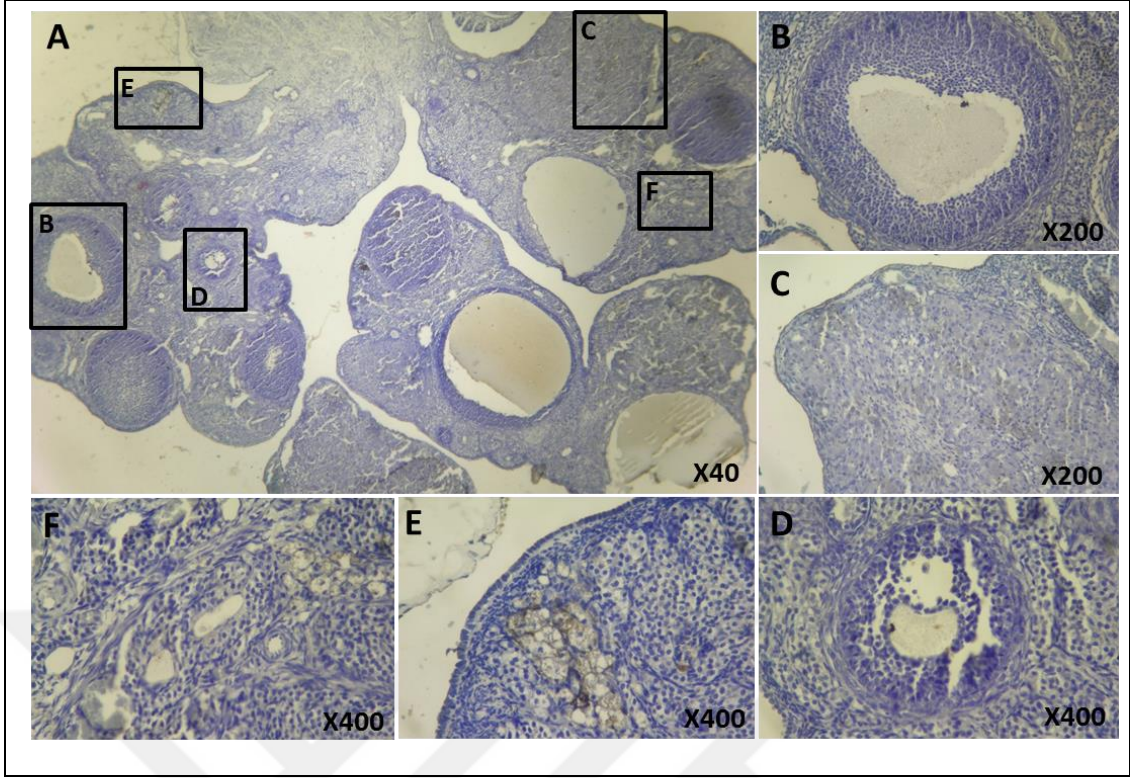
YFMŞ+BY grup sıçanların uygulama sonrası ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YFMŞ grubu ile benzer sonuçlar ortaya çıktı dolayısı ile resimler verilmedi.

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde YFMŞ grubu 1.ay kesitlerin TUNEL boyamaları ile benzer ancak medullada azalmış boyama özelliği gösterdiği bulundu (**Resim 6.43**).



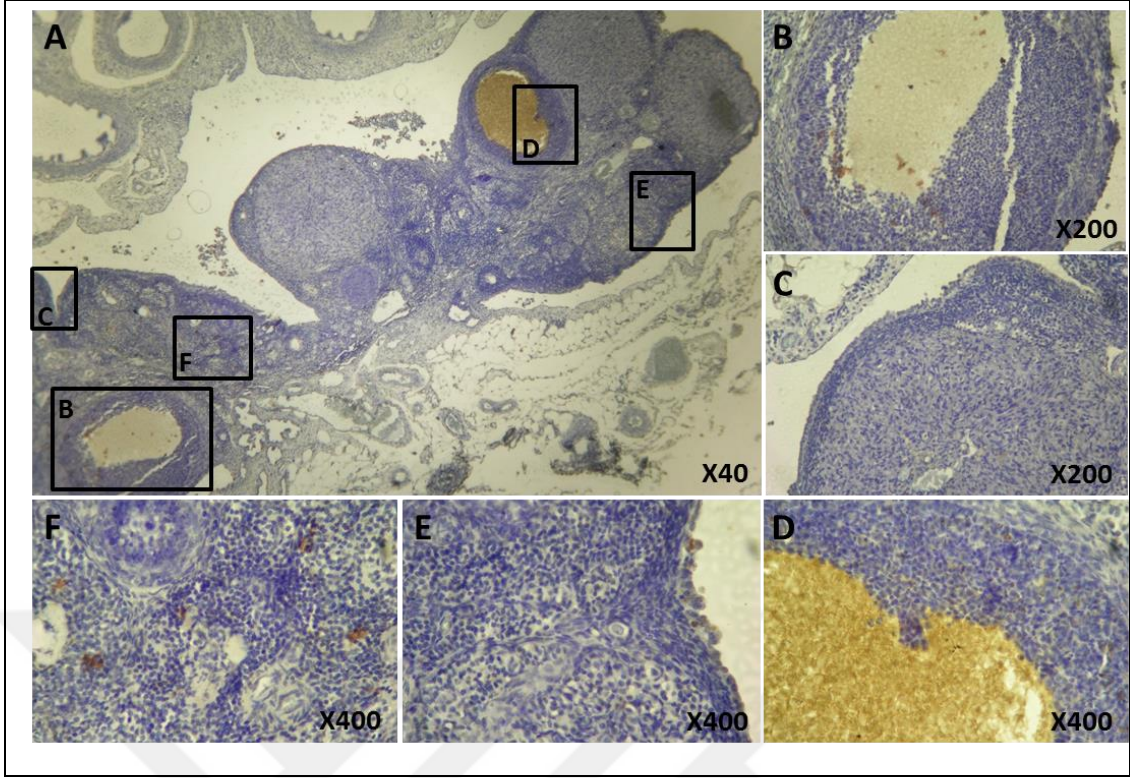
Resim 6.43 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMŞ+YDKH grubu örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korpus luteum (B), korteks (C, D), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

YFMŞ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde genel olarak TUNEL pozitif hücrelerin büyük oranda azaldığı görüldü. TUNEL pozitif hücreler gelişmiş foliküllerde ve korpus luteumda izlendi ve germinal epitel ve medullada çok az miktar boyama görüldü (**Resim 6.44**). YFMŞ+YDKH grubu uygulama sonrası overlerden alınan 1. ve 2. ay kesitlerde TUNEL boyama sonuçları karşılaştırıldığında pozitif boyamanın belirgin bir şekilde azaldığı bulundu.



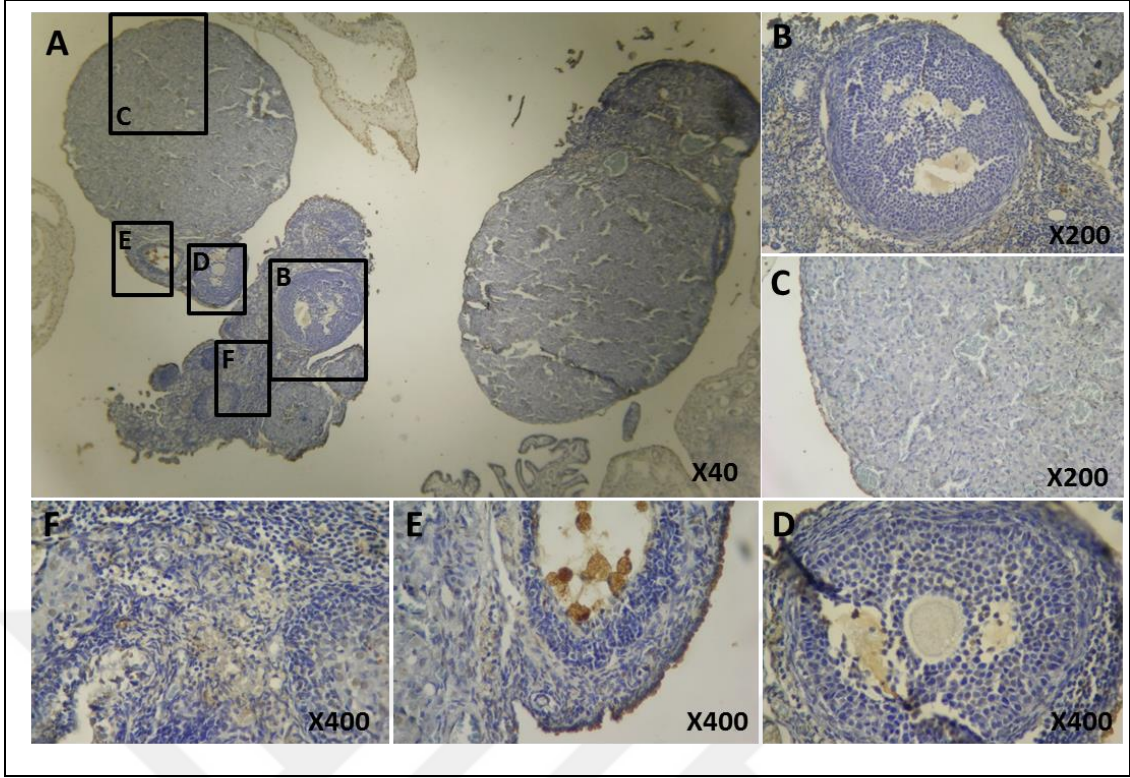
Resim 6.44 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında YFMS+YDKH grubu örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginea (E) ve medulla (F).

STZ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 1. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde genel olarak TUNEL pozitif boyamaların azaldığı gözlemlendi (**Resim 6.45**). STZ+YDKH grubu sıçanların 1.ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonuçları STZ grubu ile karşılaştırıldığında boyamanın belirgin bir şekilde azaldığı izlendi.



Resim 6.45 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında STZ+YDKH grup örneklerinde 1. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum ve tunika albuginea (C, E) ve medulla (F).

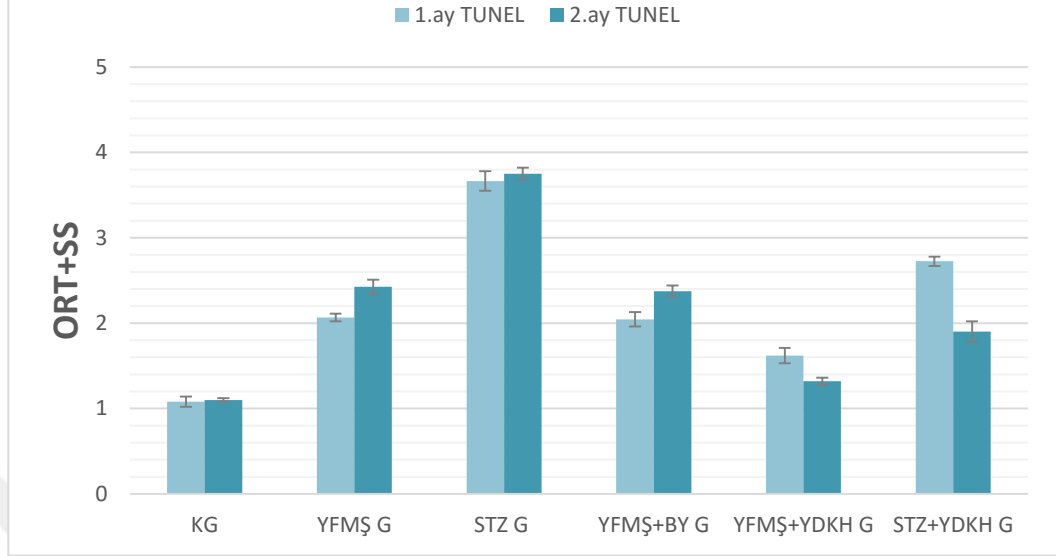
STZ+YDKH grubu sıçanların uygulama sonrası 2. ay ovaryumundan elde edilen TUNEL boyama sonrası kesitleri incelediğimizde genel olarak gelişmiş folikül etrafında, korpus luteum ve medullada az sayıda TUNEL pozitif hücre bulundu (**Resim 6.46**). STZ+YDKH grubu TUNEL için boyama sonrası 1. ve 2.ay kesitler karşılaştırıldığında apoptotik hücrelerin azaldığı saptandı.



Resim 6.46 Apoptozun belirlenmesi için TUNEL boyamalarında STZ+YDKH grup örneklerinde 2. ay kesit görüntülerinde genel (A), korteks (B, D), korpus luteum (C), tunika albuginya (E) ve medulla (F).

Apoptozun belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamalar incelenen immünohistokimya görüntülerin skorlama (**Resim 6.47**) ile yapılan morfometrik analizinde YFMŞ uygulamasının sıçan over dokularında apoptozu artırdığı ancak STZ uygulamasının apoptoz üzerinden YFMŞ uygulamasına göre daha fazla etkisinin olduğu bulundu. Hem YFMŞ uygulanan gruba hem STZ uygulanan gruba YDKH uygulama sonrası apoptozun belirgin bir şekilde azaldığı saptandı (**Tablo 6.7**).

Tüm Grupların Uygulama Sonrası TUNEL Boyama Skorlaması



Resim 6.47 Uygulama sonrası tüm grupların TUNEL boyama sonuçları incelendiği morfometrik analizinde hem YFMŞ grubunda hem STZ grubunda TUNEL pozitif ekspresyonun arttığı ancak STZ grubunda bu artışın daha belirgin olduğu saptandı. Her iki uygulama grubunda YDKH uygulaması ile apoptoz engellendi.

Tablo 6.7 TUNEL boyama sonrası morfometrik analiz istatistik verileri.

Comparison	Difference	q	P value
KG 1.ay TUNEL vs YFMŞ 1.ay	-1,070	31,039	*** P<0,001
KG 1.ay TUNEL vs STZ 1.ay	-2,670	77,454	*** P<0,001
KG 1.ay TUNEL vs YFMŞ+BY 1.ay	-1,050	30,459	*** P<0,001
KG 1.ay TUNEL vs YFMŞ+YDKH 1.ay	-0,6200	17,986	*** P<0,001
KG 1.ay TUNEL vs STZ+YDKH 1.ay	-1,730	50,185	*** P<0,001
KG 1.ay TUNEL vs KG 2.ay	-0,1000	2,901	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs STZ 1.ay	-1,600	46,414	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+BY 1.ay	0,02000	0,5802	ns P>0,05
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,4500	13,054	*** P<0,001
YFMŞ 1.ay vs YFMŞ 2.ay	-0,3600	10,443	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	0,9400	27,268	*** P<0,001
STZ 1.ay vs STZ 2.ay	-0,08000	2,321	ns P>0,05
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+YDKH 1.ay	0,4300	12,474	*** P<0,001
YFMŞ+BY 1.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-0,3300	9,573	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 1.ay	-1,110	32,200	*** P<0,001
YFMŞ+YDKH 1.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	0,3000	8,703	*** P<0,001
STZ+YDKH 1.ay vs STZ+YDKH 2.ay	0,8300	24,077	*** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ 2.ay	-1,330	38,582	*** P<0,001
KG 2.ay vs STZ 2.ay	-2,650	76,874	*** P<0,001
KG 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	-1,280	37,131	*** P<0,001

KG 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	-0,2200	6,382	**	P<0,01
KG 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,8000	23,207	***	P<0,001
YFMŞ 2.ay vs STZ 2.ay	-1,320	38,292	***	P<0,001
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+BY 2.ay	0,05000	1,450	ns	P>0,05
YFMŞ 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,110	32,200	***	P<0,001
STZ 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	1,850	53,666	***	P<0,001
YFMŞ+BY 2.ay vs YFMŞ+YDKH 2.ay	1,060	30,749	***	P<0,001
YFMŞ+YDKH 2.ay vs STZ+YDKH 2.ay	-0,5800	16,825	***	P<0,001



7. TARTIŞMA

YFMŞ eklenen gıdalar günümüzde toplumsal yaşamda ciddi bir biçimde yer almakta ve buna bağlı sağlık problemleri her geçen gün önemli olmaktadır. Günümüzde artan infertilite, diyabet, metabolik sendrom ve obezite gibi hastalıkların varlığı bu konunun önemine işaret etmektedir. Fruktoz eklenen içme suyu ile beslenen sıçanların karaciğer ve pankreas dokularında hasar oluştuğu buna bağlı olarak yapılan biyokimyasal ve histolojik analizlerde serum kolestereol, Aspartat aminotransferaz (AST), TG ve Alanin Transaminaz (ALT) düzeylerinin arttığı, dokularda ise TNF-alfa, lipaz, amilaz ve oksidatif stres indeks (OSI)'inde de artış olduğu bilinmektedir (Çiçek E 2014). Çalışmamızda YFMŞ uygulanması ile STZ uygulanarak diyabet oluşturulmuş sıçanlar karşılaştırılarak over üzerinde oluşan hasar ortaya kondu. YFMŞ uygulanan sıçanlarda kilo kaybı, overde morfolojik büyüklük, artmış kistik yapılar, konjesyon, damarlanma ve foliküllerde gelişme geriliği görüldü. STZ uygulama sonrası belirgin olarak foliküllerde atrezinin arttığı saptandı. Bu sonuçlar özellikle ucuz tatlı yenmesine bağlı üreme sorunları oluşturduğunu ve gebe kalma için bir tehdit olabileceğini düşündürdü. Daha önemlisi genç yaşta overlerde oluşan bu değişikliklere bağlı ileride oluşabilecek hormonal ve kötü huylu hücre davranışlarına işaret ettiği anlaşıldı. Bu çalışmada sıçanlara YFMŞ eklenen içme suyu verilerek ve STZ uygulanarak insülin direnci, tip 1 diyabet ve bu zeminde gelişebilecek metabolik sendrom ile over histopatolojik değişikliklerinin incelenmesi amaçlanarak yapılan deneylerde klinik tabloyu oldukça iyi yansıtan sonuçlar elde edildi. YFMŞ ve STZ uygulanma sonrası tedavi amaçlı YDKH intraperitoneal olarak verildi ve over dokusunda oluşan hasarda YDKH uygulamasının onarıcı etkisi tespit edildi. Özellikle YFMŞ uygulanan grupta YDKH uygulamasının onarıcı etkisi daha belirgin olarak saptandı. Deneklerin vücut ağırlıklarının ölçülmesi sonucu hem YFMŞ grubu hem STZ uygulama grublarında kilo kaybı saptandı. Histolojik ve immünohistokimyasal olarak over dokusunun incelenmesi sonucu YFMŞ ve STZ uygulanan örneklerde patolojik değişiklikler ortaya kondu. Ödem, konjesyon ve kist oluşumundan fibrosis bulgularına kadar geniş bir aralıkta gerçekleşen histopatolojik değişikliklerin artmış oksidatif strese bağlı olduğu eNOS ve iNOS immünohistokimya boyamaları ile, artan serbest radikallere bağlı olarak fazlalaşan bir hücre ölümünün gerçekleştiği ve burada apoptoz

mekanizmasının kullanıldığı TUNEL boyamaları ile, ayrıca artan damarlanma da VEGF boyamaları ile ortaya kondu.

YFMŞ uygulanan sıçanlarda kilo kaybının görülmesi diğer çalışmalarla (Shawky ve ark. 2014) uyumlu olmasına karşılık bazı çalışmalarda (Gözükaya 2013) kilo artışı da saptanmıştır. Bunun nedeni koşullar, YFMŞ uygulama süresi ve uygulama şekli veya sıçanların yaşı ile ilgili olabileceği düşünüldü. Yüksek fruktozlu diyet ile beslenen erkek Sprague Dawly sıçanlarda yapılan bir çalışmada 8 hafta beslenme sonrası kilo alım ve beslenme kriterlerinde kontrol gruba göre anlamlı bir düşük saptanmış ve Levosetirizin ile tedavi sonrası tüm değerlerde iyileşme görülmüştür (Shawky ve ark. 2014). YFMŞ ile yapılan diğer bir çalışmada da 12 hafta boyunca YFMŞ eklenen içme suyu ile beslenme sonrası sıçanların vücut ağırlık değişimleri karşılaştırılmış ve kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir kilo kaybı saptanmıştır (Sadi ve ark. 2014). YFMŞ diyet ile beraber verilen diğer bir çalışmada, sıçanlar 8 hafta ve 6 ay olmak üzere kısa ve uzun dönem YFMŞ'ye maruz kalmışlardır ve deney sonrası kontrol gruba göre hem kısa dönem hem uzun dönem beslenme sonrası kilo artışı saptanmıştır. Uzun dönem maruziyet aşırı kilo alımı ve abdominal yağ birikimine neden olmuştur ve bu değişiklikler dişi sıçanlarda daha belirgin olarak bulunmuştur (Bocarsly 2010). Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda YFMŞ içme suyuna eklenerek tüketildiğinde kilo kaybı ortaya çıkmaktadır ancak YFMŞ diyet ile beraber alındığında kilo artışına neden olmaktadır. Fakat kilo kaybı veya artışına neden olan mekanizma henüz açık değildir. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda da kilo kaybı saptandı ve bu sonuç diğer çalışmaların (Sadi ve ark. 2014; Nojiri ve ark. 2014) bulguları ile paralellik göstermektedir.

YFMŞ eklenen gıda tüketimi sonrası alınan fruktozun leptin üzerinden etki göstererek besin alınımını etkilediği ve obesite gibi hastalıklara yol açtığı düşünülmüştür. Maffei ve arkadaşları glukoz ve fruktozun leptin üretimi üzerine etkisini incelemek için rhesus maymunlarına intravenöz olarak fizyolojik serum, glukoz ve fruktoz infüzyonu yapmışlardır ve deney sonrası ölçülen serum glukoz, insülin, leptin düzeylerine bakıldığında glikoz infüzyonun 4-8. saatleri arasında glukoz, insülin ve leptin düzeylerinin progressif olarak arttığını ancak fruktoz infüzyonu yapılanlarda ise 8 saat süresince glukoz, insülin ve leptin düzeylerinde herhangi bir artış olmadığını göstermişlerdir (Maffei ve ark. 1995). Erkeklerde yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca günlük besine kişi başına 1.5 g/kg fruktozun

yemeklere eklenme sonrası, yüksek-fruktoz tüketimine bağlı olarak kilo artışı saptanmamıştır. Yüksek-fruktoz alınan 4 hafta içinde, deneklerde bazal plazma leptin seviyesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir bu da adipoz dokuların fruktoz ile beslenmeye yanıt verdiğini göstermiştir (Le ve ark. 2005). Sıçanlarda fruktoz ile beslenme sonucu karaciğer dokusunda GLUT2, Na/K-ATPaz enzim aktivitesi çalışılan bir araştırmada 8 hafta YFMŞ eklenen diyet ile beslenen sıçanlardan alınan kanlarda HbA1c, glikoz, adiponektin, resistin düzeyleri incelenmiştir. Sıçanlarda YFMŞ ile beslenme sonrası HbA1c, glikoz, resistin, GLUT2 düzeylerinde değişme gözlenmezken, adiponektin düzeylerinde anlamlı artış, Na/K-ATPaz aktivitesi değerlerinde anlamlı azalış saptanmıştır. Bununla birlikte fruktozla zengin beslenmenin obezite için önemli bir risk faktörü olduğu ve Na/K-ATPaz aktivitesindeki değişimlere aracılık ettiği ortaya konmuştur (Aksoy R 2013). İçme suyu ile beraber alınan fruktoz, %10 oranında karışım yapılarak verildiğinde diyet ile verildiğinin % 60'ı kadarına eşit olup (Tran ve ark. 2009) su ile içilen früktoz 6 kat daha etkili olmaktadır. Bu neden ile daha az yem tüketimi ve daha az kilo alınma neden olabilmektedir. Çalışmamızda sıçanlara %30 YFMŞ içeren içme suyu verildi. Bu neden ile sıçanların yem tüketimi azalarak kilo kaybı ortaya çıkmış olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda YFMŞ uygulanan sıçanlarda AKŞ kontrole göre arttığı ancak STZ ile karşılaştırıldığında düşük olduğu saptandı. Önceki çalışmalarda (Al-Rasheed ve ark. 2014; Babacanoglu ve ark. 2013) benzer sonuçlar bulunmuş ve özellikle STZ için AKŞ 250 mg/dl ile 350 mg/dl aralığının önemli olduğu YFMŞ için 120 mg/ml ile 180 mg/ml aralığının anlam ifade ettiği gösterilmiştir (Shawky ve ark. 2014; Al-Rasheed ve ark. 2014). Yüksek fruktozlu diyet ile beslenen erkek Sprague Dawly sıçanlarda yapılan bir çalışmada 8 hafta beslenme sonrası OGTT, ITT, AKŞ, HOMA-IR, hepatik glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri, serum total kolesterol, LDL-C, C-reaktif protein (CRP) seviyesi ve laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi ve karaciğer yağlanma puanları anlamlı bir şekilde artmıştır (Shawky ve ark. 2014). Resveratrol'un YFMŞ ile indüklenen vasküler insülin direnci üzerine etkisini araştıran bir çalışmada Wistar sıçanlar %10 ve %20 YFMŞ içeren içme suyu ile 12 hafta boyunca beslenmiştir. %20 YFMŞ içeren içme suyu ile beslenen sıçanlarda plazma TG, VLDL, kolesterol, insülin ve glikoz seviyeleri artmış bulunmuştur. YFMŞ ile beslenen sıçanların aort incelemelerinde IRS-1 ve eNOS

mRNA protein ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır (Babacanoglu ve ark. 2013). İnsanlarda yapılan bir çalışmada 355 20-60 yaş arası aşırı kilolu veya obez bireyler sukroz veya YFMS eklenen az yağlı süt ile 10 hafta boyunca beslenmiştir. Deney sonrası bireylerde hafif bir kilo artışı, HDL seviyesinde azalma ve TG seviyesinde artış saptanmıştır. Ancak kolesterol, LDL, kan basınçlarında değişiklik gözlemlenmemiştir (Lowndes ve ark. 2014). Çalışmamızdaki sonuçlar ve diğer çalışmalar beraber bakıldığında yüksek fruktoz içeren içecek ve gıda tüketimi insülin direnci oluşturarak AKŞ'in yükselmesine yol açmaktadır.

Beslenme hem hayvan hem insan üretkenliğini etkileyen ana faktördür. Anoreksi ve nevroza gibi ciddi beslenme bozukluğunda anovulatuvar infertilite, ineklerin erken laktasyonlarında görülen negatif enerji dengesi ile ilgili beslenme bozukluğunda ise zayıf fertilitate saptanmaktadır (Katz ve Vollenhoven 2000; Butler WR 2000). Buna karşılıklı aşırı beslenme ve şişmanlık da üretkenlik performansını kötü etkilemektedir. Son zamanlarda yapılan yayınlardan anlaşılmakta ki beslenmenin üretkenliğin üzerindeki etkisi karmaşık olup over üzerinden gerçekleşmektedir (Webb ve ark. 1999). Over aktivitesini etkileyen bu değişiklikler dolaşımdaki büyüme hormonu, insülin, leptin gibi hormonlar, ayrıca İnsülin büyüme faktör-2 (IGF2), IGF-bağlayıcı protein (IGF-BP), aktivinler ve sitokinler gibi parakrin ve otokrin faktörler, hedef organlardaki gonadotropinler, steroidler ve inhibitörler üzerinden gerçekleşmektedir. Fruktoz, glikoz ve galaktozun koyunlardaki over fonksiyonuna olan etkisi incelenen bir çalışmada düşük doz sistemik fruktoz infüzyonu akut bir insülin cevabı oluşturmamış fakat FSH'in baskılandığı saptanmıştır. Fruktoz infüzyonundan sonra geçici bir FSH ve insülin artışı gözlenmiş ve bu artışa over östradiol ve androstenedion salgı artışı eşlik etmiştir. Ancak sistemik glukoz ve galaktoz infüzyonu over steroidogeneze bir etki göstermemiştir. Böylece fruktozun periferik insülin ve/veya gonadotropini indirekt etkilediği ortaya konmuştur (Campbell ve ark. 2010). Primat ve insanlarda da glukoz over fonksiyonuna etki göstermekte (Giudice LC 2001) ve diğer monosakkaridler de özellikle günümüzde artmış bir şekilde tüketilmekte olan fruktoz da over fonksiyonu etkilemektedir. Fruktoz ile metabolik sendrom oluşturulmuş dişi ve erkek sıçanlarda serum ve gonadal ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının incelendiği diğer bir çalışmada bahsedilen hormonların plazma LH, FSH, östrodiol ve progesteron düzeyleri ile olan ilişkisi de incelenmiştir. Sıçanlar 12 hafta boyunca %10 fruktoz

içeren içme suyu ile beslendikten sonra açlık serum insülin, glukoz, ALT, GGT, TG, LDL-kolesterol (LDL-K), total kolesterol düzeyleri yükselmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Metabolik sendrom oluşturulmuş sıçanların serum nesfatin-1 düzeyi kontrol gruba göre anlamlı artış gösterir iken ghrelin, obestatin düzeyleri düşmüş, üreme organlarında yapılan immünohistokimyasal incelemelerde de hormonal ekspresyonun benzer olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak dişi sıçanlarda serum FSH ve progesteron düzeyi azalır iken östrodiol ve LH düzeyleri artmış bulunmuş ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (Aydın S 2012). Tüm bu çalışmalar fruktoz tüketiminin metabolik sendroma yol açtığını göstermek ile beraber bu metabolik bozuklukların üreme hormonları dahil olmak üzere çeşitli hormonal düzeyleri etkileyerek over fonksiyonu etkilediğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda YFMŞ içeren içme suyu ile beslenme sonrası ovulasyon sürecinde sıçan ovaryum örneklerinde folikül sayıları, gelişimi ve oosit oluşumu ile gerileme sürecinde korpus luteum oluşumu, parankim değişiklikleri ve fibrosiz süreci H-E boyamalarında değerlendirilerek oluşan histopatolojik bulguların oksidatif stres, apoptoz ve damarlanma açısından ilişkisi eNOS, iNOS, TUNEL ve VEGF boyamaları ile ortaya kondu. Literatürde değişik nedenlerle incelenen sıçan overindeki değişikliklere benzer şekilde ortaya konan patolojik bulgular yüksek fruktoz içerikli tatlandırıcıların over hasarı yaptığı ve folikül gelişimini olumsuz yönde etkilediği bulundu. YFMŞ ile beslenmenin over üzerinde olumsuz etki yapması kadın infertilitesi ile ilişkili olabileceğini gösterdi. Buna ek olarak bu hasarın onarımı için KH etkisi ilk olarak ortaya konuldu. YFMŞ ile 8 hafta boyunca beslenen sıçanlara YDKH tedavi amaçlı uygulandığında patolojik bulgularda belirgin iyileşme saptandı. Tip I diyabet oluşturulan STZ uygulanan sıçanlarda da YDKH uygulama sonrası patolojik değerlerde iyileşme görüldü ancak bu onarıcı etkinin YFMŞ uygulanan gruba göre daha hafif olduğu belirlendi.

YFMŞ ile beslenmenin over dokusunda PKOS benzeri patolojik değişimlere yol açtığı yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Gözükaya 2013). PKOS modeli yapılmaya çalışılarak overyan hipertrofi, tunika albuginyada kalınlaşma, subkapsüler kistik foliküler yapılar, matür folikül yapıları, overyan stromada hiperplazi, intersitisyel hücrelerdeki artış, folliküler atrofi, nadir izlenen geç primer ve sekonder folliküller, granüloza tabakasında incelme ve atrofik patern, dejeneratif çeşitli folliküllere ait

görünüm, teka interna tabakası hücrelerinde sayıca artış ve teka hücrelerinde artmış lipid vakuolleri, graaf follikül görülmemesi ile polikistik overin özelliklerine uyan bulgular saptanmıştır. Yazarlar bunu PKOS durumunda artmış bir oksidatif stresin varlığını ve bunun karşılığında kompensatuar olarak yetersiz de olsa antioksidanlarda bir artış olarak açıklamışlardır (Dikmen A ve ark. 2012; Sheludiakova ve ark. 2012). Direk olarak etkinin yanısıra şeker karışımlarının ve mısır şuruplarının leptin, insülin, büyüme faktörleri ve ghrelin gibi faktörler üzerinden de over dokusunu etkilediği düşünülmektedir (Bray ve ark. 2004; Melanson ve ark. 2007).

YFMŞ uygulamaları yapılan sıçanların over dokularında H-E ile boyama sonrası bulunan patolojik bulguların oksidatif stres ile ilişkisini ortaya koymak amaçlı yapılan eNOS ve iNOS immunhistokimya boyamalarında kontrol grubta bazal seviyede var olan eNOS ve iNOS ekspresyonlarının YFMŞ uygulanan sıçan overlerinde özellikle arttığı bulundu. Serbest radikal türleri stabil değildirler ve yüksek reaktiviteye sahiptirler. Serbest radikal türleri nükleik asitler, lipidler, proteinler, karbonhidratlar veya çevredeki herhangi bir molekülden elektron alarak stabil olurlar ve böylece kademeli bir zincir reaksiyonu oluştururlar bu da hücre hasar ve hastalıklara neden olur. Reaktif nitrojen türleri serbest radikal türlerindedir ve NOS enzimlerini içerir. NOS enzimleri tarafından üretilen NO birçok fizyolojik olaylarda düzenleyici olmakla beraber artmış NO'nin hücre ve dokulara toksik etkisi bulunmaktadır. Önceki çalışmalarda başka nedenler ile başka dokularda arttığı saptanan bu belirteçlerin (Babacanoglu ve ark. 2013) YFMŞ uygulanması ile de overde arttığı tespit edildi. Patolojik durumlarda NO üretimi esas olarak iNOS tarafından yapılmaktadır. Birçok organda iNOS sadece immünolojik tetiklere cevap olarak eksprese olmaktadır (Lee ve ark. 2000). Reaktif nitrojen türlerinin kadın infertilitesi ile ilişkili olduğu ve nitrojen türlerinin endometriyum, tuba uterina ve over üzerinden etki göstererek kadın fertilitatesini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Rosselli M ve ark. 1996; Ekerhovd ve ark. 1997; Bedaiwy ve Falcone 2003). Folikül gelişim sırasında eNOS teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oositin yüzeyinde eksprese olmaktadır. NO folikül gelişimi, granüloza hücrelerin gelişimi, ovulasyon ve lutenizasyona olan etkisinin siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) aracılığı ile sekonder haberci olarak veya ROS oluşturarak gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir (Hanafy ve ark. 2001). Nöronlar, kan damarları ve immün sistem

hücreleri üreme organların ayrılmaz parçalarıdır NO bu sistemlerde önemli fonksiyonlara sahip olduğundan üreme fizyolojisi ve biyolojisinin düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Son immün efektör olarak iNOS tarafından üretilen NO, patojenleri ve abnormal hücreleri öldürme kapasitesine sahip olmak ile beraber, iNOS'un sürekli ekspresyonu normal doku hücrelerin zarar görmesine de neden olabilmektedir (Agarwal ve ark. 2005). YFMŞ uygulama sonrası artan NOS ekspresyonu overdeki oksidatif stresin arttığını ve buna bağlı olarak organda hasar oluşturduğunu işaret etmektedir.

Proöstrus evresinde ovaryum dokusunda primer, sekonder ve Graaf follikülü yapılarında artış ile birlikte ovaryum dokularının normal histolojik yapısını koruduğu, östrus evresinde ise ovaryumda Graaf follikülleri ve korpus luteum yapılarında artış olduğu gözlemlendi. Bu aşamalarda normal overde bazal seviyede oksidatif stres olduğu, buna bağlı olarak korpus luteum ve çevresinde apoptozun gerçekleştiği ayrıca damarlanmanın arttığı bilinmektedir (Campbell ve ark. 2010; Miao ve ark. 2012; Yu Z ve ark. 2013). Çalışmamızda kontrol örneklerindeki bulguların literatür ile uyumlu olduğu ayrıca YFMŞ ve STZ uygulanan örneklerde bu parametreler açısından artmış bir patolojinin var olduğu saptandı. Önceki çalışmalarda tip I diyabete bağlı hiperglisemi ve hiperlipidemi oluşumunun azalan insülin salınımı ile birlikte olduğu ve eNOS aktivitesinin insülin reseptörleri üzerinden sinyal etkisi gösterdiği saptanmıştır (Fujimoto ve ark. 2005). Benzer şekilde früktoz ile de oluşabilen metabolik sendromda hiperinsülinemi ve hiperglisemi ortaya çıkmakta ve artan insülinimiye bağlı karaciğerden VLDL üretilmekte böylece artan TG salgısı (Basciano H ve ark. 2005) ile ovarian theca interna androstenedione üretimini artırarak hücresel değişikliklere neden olmaktadır (Baptiste CG ve ark. 2010). STZ uygulanarak oluşturulan tip I diyabet ile YFMŞ uygulanarak oluşturulan metabolik sendromun hormonal dengede gerçekleştirdiği bozuklukların mekanizmasının farklı olması YDKH uygulama sonrası elde edilen onarıcı etkinin boyutunun farklı olmasına yol açmış olabileceği düşünüldü.

Foliküler ve luteal gelişimde farklı VEGF ekspresyonu bulunmaktadır. VEGF ekspresyonu erken dönem foliküllerde zayıf iken folikül gelişmesine bağlı olarak granüloza ve teka hücrelerinde belirginleşmeye başlar (Barboni ve ark. 2000). Sıçanlarda VEGF dıştan stimüle edildiğinde küçük ve preantral folikül oluşumu ve folikül gelişimi artmıştır (Danforth ve ark. 2003). VEGF'in over üzerindeki etkisi

karmaşıktır. Ancak VEGF'in Flk-1 ve Flt-1 reseptörleri ile etkileşerek folikül ve korpus luteumda anjiyogenezisi tetiklediği bilinmektedir (Shimizu T ve ark. 2002; Greenaway J ve ark. 2004). VEGF kan damarların geçirgenliğini artırma özelliği nedeni ile vasküler geçirici faktör olarak bilinmiştir. Over dokusunda vasküler geçirgenliğin düzensizliği ovaryan hiperstimulasyon sendrom (OHSS) gibi üreme bozukluklarına yol açabilir ayrıca artmış VEGF ve VEGF reseptör ekspresyonunun OHSS ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gomez R ve ark. 2003). Buna ek olarak VEGF ekspresyonunun foliküllerin ovaryan siklusa girmesinde önemli olduğu da bildirilmiştir (Zimmermann RC ve ark. 2002). Çalışmamızda uygulama sonrası over dokularında damarlanma durumunun belirlenmesi amaçlanarak yapılan VEGF immünohistokimya boyamalarında kontrol grup ile karşılaştırıldığında YFMŞ ve STZ uygulanan gruplarda VEGF ekspresyonunda belirgin bir artış bulundu. YFMŞ ile beslenme sonrası VEGF ekspresyonunun artması diğer çalışmalar (Gözükaya 2013) ile uyumlu olarak bulundu. YFMŞ uygulama sonrası VEGF ekspresyonundaki anormal artış over dokularındaki vasküler düzenin bozulduğuna işaret etmektedir. VEGF sinyal yolağının ovaryan kanserlerinde anjiyogenezisi düzenlediği ve vasküler geçirgenliği artırarak asit oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Paley PJ ve ark. 1997). Bu neden ile YFMŞ uygulaması sonrası VEGF aşırı ekspresyonu bu tür hastalıkların oluşumu için önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda uygulama sonrası over dokularında gerçekleşen apoptozun belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamalarında kontrol grup ile karşılaştırıldığında hem YFMŞ hem STZ uygulanan gruplarda artmış TUNEL ekspresyonu saptandı. Artmış TUNEL pozitif ekspresyonun granüloza hücrelerinde olduğu tespit edildi. STZ uygulanan gruplarda over dokusunda TUNEL pozitif hücrelerin YFMŞ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu bulundu. YFMŞ grubunda daha sıklıkla antral foliküllerde görülen TUNEL pozitif ekspresyonu STZ uygulanan gruplarda sekonder foliküllerde de izlendi. YFMŞ uygulamaları ile artan hücre ölümünün bu şekerin over dokusuna yaptığı olumsuz etkilerinde apoptoz mekanizmasının kullanıldığını gösterdi. Yüksek fruktoz eklenen gıda tüketiminin diyabet ve metabolik sendrom gibi hastalıklar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsülin direnci ve/veya hiperinsülineminin fertilitiyi etkileyen PKOS gibi hastalıkların patolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir ancak bunun altında yatan mekanizma henüz açık değildir. İnsülin direnci ve/veya hiperinsülinemi

durumlarında over dokusunda gerçekleşen patogenezin mekanizmasını araştıran bir çalışmada insülin direnci ve/veya hiperinsülinemi olan PKOS hastalarından alınan serum örneklerinde Yüksek Mobilite Grup Box 1 (high-mobility group box 1, HMGB1) proteinin arttığı bulunmuş ve kültür ortamında sıçan ovarian granüloza hücreleri yüksek insüline maruz kaldıklarında da ekstrasellüler HMGB1 ekspresyonunda artışı saptanmıştır. Bu bulgular insülin direnci ve/veya hiperinsülinemi durumlarında ekstrasellüler HMGB1 artışına bağlı olarak ovarian granüloza hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermektedir (Ni XR ve ark. 2014). Çalışmamızda da gözlenen granüloza hücrelerinde gerçekleşen YFMŞ uygulama sonrası artmış apoptozun nedenini PKOS patolojisinde meydana gelen apoptoz ile benzer mekanizma kullanmış olabilir.

CHO-K1 sıçan over hücre dizininde kamptotesin, seramid, chelerythrine, etoposid, farnesol ve geranil geraniyol gibi çeşitli sitotoksik ilaçlar kullanılarak apoptoz veya programlanmış hücre ölümü indüklenen bir çalışmada apoptoz gerçekleşen hücrelerde glikolitik ve fosfolipid metabolitlerinde belirgin değişiklikler saptanmıştır. Özellik ile glikolitik intermediyatör olan fruktoz-1,6-bisfosfat düzeyinde anlamlı bir artış bulunmuştur (Williams SN ve ark. 1998). Fruktoz metabolizmasında da fruktoz-1,6-bisfosfat yer almaktadır. Diğer bir çalışmada PKOS oluşturulan sıçanların over dokularında proliferasyon, apoptoz ve steroidojenik enzimlerin ekspresyonu incelenmiştir. Hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan Ki-67 protein ekspresyonunun kontrol gruptaki granüloza hücrelerinde ve PKOS gruptaki teka interna hücrelerinde yüksek olduğu, ancak hücre ölümde rol oynayan kaspaz-3 ekspresyonunun ise PKOS gruptaki granüloza hücrelerinde ve kontrol gruptaki teka interna hücrelerinde yüksek olduğu saptanmıştır. Steroidojenezde rol oynayan CYP11A1 protein ekspresyonu kontrol grup ve PKOS grubundaki granüloza, teka interna ve intertisyel hücrelerde benzerlik göstermesine rağmen CYP17A1 ve CYP19A1 proteinleri PKOS gruptaki granüloza ve intertisyel hücrelerde artmış olarak bulunmuştur. Teka interna ve intertisyel hücrelerdeki enzimatik değişiklikler PKOS durumunda oluşan yüksek androjen ve östrodiyol seviyelerine neden olmuştur (Lombardi LA ve ark. 2014).

Sıçan teka-intertisyel hücreleri kültür ortamında insüline maruz kaldığında proliferatif etki göstermekte ve PKOS gibi ovarian bozukluklarında da teka-intertisyel hücreleri hiperplaziye uğramaktadır. Resveratrol kültür ortamında teka-

intertisyel hücrelerin apoptozunu indükleyerek ve DNA sentezini etkileyerek hiperinsülinemi ortamda insülinin teka-intertisyel hücreleri üzerindeki proliferatif etkisini azaltmaktadır (Wong DH ve ark. 2010). Benzer bir çalışmada antioksidan olan vitamin E ve ebselen sıçan ovaryan teka-intertisyel hücreleri ile beraber kültür edilmiştir ve deney sonrası her iki antioksidan teka-intertisyel hücrelerinde kromatin yoğunlaşması, nükleer küçülme ve piknoz gibi apoptotik özellik gösteren morfoloji sergilemiş ve bu hücrelerde kaspaz 3/7 ekspresyonu da artmıştır (Rzeczynska IJ ve ark. 2010).

Zhang J ve arkadaşları (2007) bir dehidroepiandrosteron (DHEA) karşılığı olan sodyum prasteron sülfat ile PKOS indüklenen sıçan modelinde granüloza hücrelerindeki apoptoz ve Tümör Nekrozis Faktör ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand (TRAIL) ekspresyonlarını araştırmışlardır. Sonuç olarak PKOS indüklenen sıçanların antral folikül granüloza hücrelerinde kontrol gruba göre apoptoz oranı ve TRAIL ekspresyonu belirgin bir artış göstermiştir. Ve bu PKOS durumunda granüloza hücrelerinde gerçekleşen apoptozun düzenlenmesinde TRAIL proteinin rol oynadığını göstermektedir (Zhang ve ark. 2007). Sıçanlarda DHEA ile PKOS oluşturulan diğer bir çalışmada overyan foliküllerde proapoptotik protein olan Bax ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonları incelenmiştir. Bax ve Bcl-2 proteinlerin antral foliküllerin granüloza hücrelerinde lokalize olduğu, PKOS oluşturulan sıçanların over dokusunda preantral ve antral foliküllerde Bax ekspresyonu daha fazla olduğu, buna karşılık kontrol gruptaki preantral ve antral foliküllerde ise Bcl-2 ekspresyonu daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Bax/Bcl-2 oranlarına bakıldığında PKOS grubunda kontrol gruba göre önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır. Bu neden ile Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarındaki dengesizlik gelişmekte olan foliküllerin kistik foliküllere dönüşmesi ile ilişkili olabilir (Bas D ve ark. 2011). Sıçan PKOS modelinde foliküllerdeki atrezi mekanizmasını araştıran bir çalışmada DHEA ile PKOS oluşturulmuş sıçanların over dokularında Fas, Fas ligand, kaspaz-8 ve membran-tip1 matriks metalloproteinaz (MT1-MMP) ekspresyonları incelenmiştir. Sonuç olarak PKOS oluşturulan sıçan overlerinde Fas ligand proteini ve mRNA, kaspaz-8 protein ve MT1-MMP mRNA kontrol gruba göre anlamlı bir artış göstermiştir. İmmünohistokimya analizinde MT1-MMP ve Fas ligandının TUNEL pozitif apoptotik granüloza hücreleri ile ko-lokalize olduğu saptanmıştır (Honma H ve ark. 2006). Çalışmamızda YFMŞ uygulama sonrası sıçan

over dokularında PKOS benzeri patolojik değişiklikler saptandı dolayısıyla granüloza hücrelerindeki apoptozun artışı PKOS modellerinde gösterilen apoptozun mekanizması ile benzerlik gösterebileceğini düşündürdü. Ancak bahsedildiği gibi PKOS modelinde oluşan patolojinin mekanizması henüz anlaşılmış değildir ve TRAIL, HMGB1, Bax ve Bcl-2 gibi çeşitli proteinler bu patolojinin oluşmasında rol oynamaktadır.

KH uygulamaları günümüzde artan bir şekilde yeni tedavi yöntemi olarak ortaya çıkmaktadır ve sadece deneysel hayvan modellerinde değil klinik çalışmalarda da uygulanmaya başlamıştır (Lang SJ ve ark. 2015). KH ve KH tedavisinin üreme sistemi için de önemli olduğu bildirilmiştir (Duke ve Taylor 2013). Çalışmamızda YFMŞ ve STZ uygulanarak oluşturulan metabolik sendrom ve tip 1 diyabet modelinde over dokusunda oluşan hasar tespit edildi ve bu hasar sonrası YDKH'nin iyileştirici etkisi incelendi. Sonuç olarak YDKH uygulama sonrası YFMŞ ve STZ uygulanan tüm gruplarda histopatolojik bulgularda azalma, oksidatif stresi gösteren eNOS ve iNOS ekspresyonlarında azalma, VEGF ekspresyonunda ve TUNEL ekspresyonunda da azalma saptandı. YDKH uygulaması YFMŞ ile beslenen sıçanlarda over dokusunda daha belirgin bir iyileşme sağlar iken STZ uygulanan gruplarda etki daha hafif olarak bulundu.

YDKH mezenkimal kök hücre sınıfındandır ve erişebilirliğin kolay, kaynağının çok ve etik problemlerden yoksun olması nedeni ile araştırmalarda tercih edilen KH kaynağı olmaktadır. YDKH hücrelerin kemoterapi ajanı olan siklofosamid ile oluşan over hasarındaki etkisi araştırılan bir çalışmada fareler 15 gün boyunca siklofosamid'e maruz kalmışlardır ve ardından 1 hafta ve 1 ay olmak üzere farklı süre YDKH intravenöz veya direkt bilateral overlere enjekte edilmiştir. Deney sonrası YDKH transplantasyonun overdeki folikül sayısını artırdığı ve immünofloresan incelemelerinde ise TUNEL boyamaların azaldığı saptanmıştır. YDKH takip edildiğinde bu hücrelerin direkt olarak folikülün hücre bileşelerine dönüşmediği ancak mikroarray analizi sonucu bazı genlerdeki değişikliklerin folikül formasyonuna neden olabildiği gösterilmiştir (Sun M ve ark. 2013). Yine benzer bir çalışmada cisplatin ile POF oluşturulan sıçanlarda Kemik İliği Mezenkimal KH (KİMKH) enjeksiyonu sonrası KİMKH'nin over dokusundaki homing özelliği ve iyileştirici etkisi incelenmiştir. Deney sonrası KİMKH enjekte edilen gruptaki sıçanlarda antral folikül ve östrodiol seviyesinde artış ile beraber granüloza

hücrelerindeki apoptozun azaldığı saptanmıştır. Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent protein, GFP) içeren KİMKH'lerin over dokusuna göç ettikleri ve hilum ve medullada yerleştikleri ancak kortekste folikül ve korpus luteumda bulunmadıkları tespit edilmiştir (Liu J ve ark. 2014). Diğer bir çalışmada GFP+ YDKH ve GFP+ dişi germ hattı KH cisplatin ile over hasarı oluşturulan sıçanlara intraovaryan olarak enjekte edilmiştir ve enjeksiyondan 7 gün sonra incelen over dokularında normal yapılara sahip folikül sayısının arttığı ve GFP+ hücreler saptanmıştır (Terraciano P ve ark. 2014). Kilic S ve arkadaşları (2013) KİMKH'nin siklofosamid ile indüklenmiş over hasarındaki etkisini araştırmışlardır ve KH uygulanmayan grupta artmış kaspaz-9 ve TUNEL ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Bunun ila birlikte KİMKH GnRH analogu ile beraber uygulandığında germ hücrelerin apoptozu ve DNA hasarı daha iyi korunmuştur (Kilic S ve ark. 2013).

Diyabetik sıçanlarda over hasarı incelen bir çalışmada plazma malondialdehit, pentraksin-3, glutatyon ve anti-müllerian hormon düzeyleri ölçülmüş ve diyabetik sıçanlarda glutatyon ve anti-müllerian hormon düzeyleri istatistiksel olarak kontrol gruba göre düşük iken malondialdehit ve pentraksin-3 düzeyleri yüksek saptanmıştır. Histokimyasal incelemelerde diyabetik grupta stromal dejenerasyon, foliküller dejenerasyon ve stromal fibrozis skorları belirgin olarak yüksek olmak ila beraber immünohistokimyasal incelemelerde nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Diyabetik sıçanlarda primordiyal ve primer folikül sayısında anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Sonuç olarak diyabetes mellitus erken dönem folikülleri etkilemektedir ve NF- κ B sinyal yolağı bu patolojinin gelişiminde rol oynamaktadır (Erbaş O ve ark. 2014). STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçan modelinde yapılan bir çalışmada diyabetik sıçanların serum örneklerinde TGF- β , MDA ve pentraksin-3 gibi inflamatuvar ve oksidatif stres markerleri istatistiksel olarak artmış bulunmuştur ve exenatid ile tedavi sonrası bu markerlerde belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir (Artunc-Ulkumen ve ark. 2014). Rahavi H ve arkadaşları (2015) STZ uygulanarak diyabet oluşturulan farelerde YDKH etkisini araştırmak amacı ile YDKH, splenosit ve beta-hücrelerini birlikte kültür etmişlerdir. Kültür edilen reaktif splenositlerin beta-hücrelerine olan baskılayıcı etkisinin YDKH varlığında azaldığını aynı zamanda beta-hücrelerin insülin salgılama kapasitesinin de arttığını göstermişlerdir. YDKH uygulamasının IFN- γ , IL-2, ve IL-17 gibi proinflamatuvar

sitokinleri azaltarak, TGF- β , IL-4, IL-10, ve IL-13 gibi regülatör sitokinleri artırarak beta-hücrelerini koruduğu bildirilmiştir (Rahavi H ve ark. 2015). Son zamanki çalışmalar MKH'lerin immünomodülatör ve immünbaskılayıcı etkisin olduğunu ve bu etkinin sadece T lenfositler üzerinden değil B lenfosit, dendritik hücreler ve NK hücreleri üzerinden de gerçekleştiğini göstermiştir (Salem ve Thiernemann 2010). İn vitro araştırmalar MKH'lerin hem direkt hücre-hücre etkileşimi hem salgıladığı faktörler ile immünomodültör fonksiyon gördüklerini göstermiştir MKH'ler immün hücrelerin proliferasyonu inhibe edebilir, inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını azaltabilir ve immün hücrelerin hücre tipini regülatör tipe değiştirebilir. MKH'lerin immün regüle edici etkisi IL-10, TGF- β , indolamin 2,3-dioksijenaz, NO, prostaglandin-E2 ve İnsan Lökosit Antijen-G (Human Leukocyte Antigen-G, HLA-G) gibi anti-inflamatuvar faktörler salgılayarak gerçekleşmektedir (Yang ve ark. 2009; Selmani ve ark. 2009).

Özetle çalışmamızda YFMSŞ uygulamasının over dokularında oksidatif stresi artırarak, vasküler düzeni bozarak ve apoptozu artırarak hasara yol açtığı belirlendi. Over dokusunda ortaya çıkan bu hasarın oksidatif stres açısından NOS ekspresyonlarını artırarak gerçekleştiği anlaşıldı. Tüm bu patolojik değişikliklerin YFMSŞ ile beslenme sonrası ortaya çıkan metabolik bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Tedavi amaçlı olarak YDKH uygulanması YFMSŞ ile oluşan patolojik bozuklukların onarılmasında etkili olarak bulundu. Bu onarıcı etkinin YDKH tarafından salgılanan çeşitli sitokinler tarafından gerçekleştiği düşünülmektedir. YFMSŞ uygulamasının tam olarak hangi mekanizma ile insülin direnci oluşturduğu henüz açıklanmamıştır ve ilerleyen çalışmalar ile bu konunun araştırılması gerekmektedir. YDKH YFMSŞ ile ortaya çıkan metabolik bozuklukların onarımında etkili olabilir ve tip II diyabet, metabolik sendrom gibi durumlarda ortaya çıkan fertilité problemlerin çözülmesinde de tedavi amaçlı kullanılabilir.

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

YFMŞ eklenen gıdalar günümüzde toplumsal yaşamda ciddi bir biçimde yer almakta ve buna bağlı sağlık problemleri her geçen gün önemli olmaktadır. Günümüzde artan infertilite, diyabet, metabolik sendrom ve obezite gibi hastalıklarındaki artış bu konunun önemine işaret etmektedir.

Çalışmamızda YFMŞ içme suyu olarak verilen sıçanlarda hiperglisemi saptandı. Bu da YFMŞ tüketiminin tip II diyabet veya metabolik sendrom gibi hastalıklara neden olabileceğini veya oluşumuna katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Bu direk etkilerinin bir sonucu olarak veya overde oluşan değişikliklere bağlı olarak üreme sağlığının etkilenebileceği görülmektedir. Bu anlamda önemli bir organ olarak over fonksiyonel bir durumdadır.

Bu açıdan bakıldığında sıçanların over dokularında oksidatif stresin, damarlanmanın ve apoptozun arttığı tespit edildi. Over dokusundaki bu değişiklikler ve gözlenen metabolik değişiklikler kadın fertilitelerini etkileyen PKOS gibi önemli hastalıkların oluşumunda önemli olabilmektedir.

İnfertilite tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan IVF ve İSSİ yöntemleri infertilite problemlerini azaltmış olsa bile canlı bebek elde etme oranının düşük olması nedeni ile önleyici hekimliğin veya yeni tedavi yöntemlerin araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda yeni tedavi arayışı olarak YDKH uygulandı ve YFMŞ tüketimi sonrası oluşan patolojik değişiklikleri azalttığı ayrıca over dokusunda oluşan patolojik bozuklukların belirli bir ölçüde iyileştiği saptandı. STZ uygulanarak tip I diyabet oluşturulan sıçanlarda da YDKH uygulamasının iyileştirici etkisi olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre YFMŞ ile oluşan olumsuz değişikliklerin engellenmesi için glukoz kullanımı ve tatlı tercihinde ucuz ürünlerden kaçınmanın gerektiği görülmektedir. Metabolik sendrom, diyabet ve infertilite gibi hastalıkların oluşumunu engellemek açısından YFMŞ eklenen içecek ve yiyeceklerin azaltılması önerilir. Bir şekilde ucuz tatlıya maruz kalınıyorsa antioksidan besinler veya tedavi edici ilaçların kullanılması düşünülmelidir.

Kök hücrenin YFMS ile oluşan olumsuz değişiklikleri azalttığı ve hiçbir komplikasyona neden olmadığı görüldü. Bir zarar vermemiş olması nedeni ile metabolik bozukluğa aday veya hasar gören hastalarda kök hücre sel tedavinin düşünülmesi gerektiği düşüncesine varıldı. Bu çalışmadan çıkan sonuçlar bu durumdaki hastalara faz çalışması yapılmasını destekler niteliktedir.



9. KAYNAKLAR

- Alhadlaq A., Mao J.J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem. Cells and Dev.*, 13(4); 436-448. 2004.
- Agarwal A, Gupta S and Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Review Open Access. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005.
- Aksoy R. Glukoz, fruktoz ve nişasta bazlı şekerler ile beslenmiş sıçanlarda Na^+/K^+ ATPaz (E.C.3.1.6.37) ve glut aktivitesinin ve bazı adipositokinlerin araştırılması. Yüksek lisans Tez. 2013.
- Al-Rasheed N, Bassiouni Y, Faddah L, Mohamad AM. Potential protective effects of *Nigella sativa* and *Allium sativum* against fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of Oleo Science* Copyright ©2014 by Japan Oil Chemists' Society *J. Oleo Sci.* 63, (8) 839-848 (2014).
- Arslan M, Atmaca A, Ayvaz G, Başkal N, Beyhan Z, Bolu E, Can S, Çorakçı A, Dağdelen S, Demirağ NG, Demirer AN, Erbaş T, Gürsoy A, Güllü S, Dağcı Ilgın Ş, Karakoç A, Kulaksızoğlu M, Şahin M, Tanacı N, Törüner F, Tütüncü NB, Üçkaya G, Yetkin İ, Yılmaz M. Metabolik sendrom kılavuzu. © Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği • 2009.
- Artunc-Ulkumen B, Pala HG, Pala EE, Yavasoglu A, Yigitturk G, Erbas O. Exenatide improves ovarian and endometrial injury and preserves ovarian reserve in streptozocin induced diabetic rats. *Gynecol Endocrinol.* 2015 Mar;31(3):196-201. Epub 2014 Nov 4.
- Aydın A. Uzun süre fruktoz içen sıçanlarda resveratrol verilmesinin vazodilatör cevap üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans Tez. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2009.
- Aydın S. Fruktozla metabolik sendrom oluşturulmuş ratlarda serum ve gonadal ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının incelenmesi. Tıpta uzmanlı tez. 2012.

- Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F. Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food and Chemical Toxicology* Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122:42–52. 2010.
- Barboni B, Turriani M, Giovanna G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 63:858–864. 2000.
- Bas D, Abramovich D, Hernandez F, Tesone M. Altered expression of Bcl-2 and Bax in follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Cell Biol Int*. 2011 May;35(5):423-9.
- Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2:5. 2005.
- Bedaiwy MA, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. *Minerva Ginecol* 2003, 55:333-345.
- Benjamin C. Pearson education © 2004.
- Bocarsly ME, Powella ES, Avenaa NM, Hoebela BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Volume 97, Issue 1, November 2010, Pages 101–106.
- Bray GA, Nielsen SJ and Barry M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Popkin Am J Clin Nutr* 2004;79:537–43. © 2004 American Society for Clinical Nutrition.
- Bulut İK ve Mir S. Fruktöz ve böbrek hastalıkları. *Cumhuriyet Tıp Derg* 2011.
- Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60–61 449–457. 2000.

- Campbell BK, Kendall NR, Onions V and Scaramuzzi RJ. The effect of systemic and ovarian infusion of glucose, galactose and fructose on ovarian function in sheep. *Reproduction* (2010) 140 721–732.
- Chaffin CL, Latham KE, Mtango NR, Midic U, Vandervoort CA. Dietary sugar in healthy female primates perturbs oocyte maturation and in vitro pre-implantation embryo development. *Endocrinology*. 2014; 155:2688–2695.
- Chen L, Qin F, Ge M, Shu Q, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in heart disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014 Oct;7(7):651-63. Epub 2014 Sep 10. Review.
- Coşkun Ö, Kanter M, Korkmaz A and Oter S. Quercetin A flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas, *Pharmacological Research*, 51, 117-123 p, 2005.
- Çelik Ö, Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. 2012.
- ÇİÇEK E. C vitamini ve aspirin, mısır şurubu (fruktoz) tüketiminin oluşturduğu organ hasarlarına karşı koruyucu olabilir mi? Doktora tez. 2014.
- Dağdelen H. Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş ve metformin-insülin ile diyabet tedavisi gören ratlarda, oleuropeinin hiperglisemi, total oksidan ve total antioksidan kapasite üzerine etkileri. Yüksek lisans tez. 2011. Kafkas Üniversitesi Fizyoloji AD.
- Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod* 68:1736–1741. 2003.
- Değirmenci İ, Üstüner MC, Kalender Y, Kalender S and Güneş HV. The effects of acarbose and *Rumex patientia* L. on ultrastructural and biochemical changes of pancreatic β -cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 555-559 p, 2005.

- Deng C, Liu B, Zhang J. Primary culture of adipose-derived stromal cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2014 Aug;31(4):842-5. Chinese. PubMed PMID: 25464799.
- Dikmen A, Ergenoglu AM, Yeniel AO, Dilsiz OY, Ercan G, Yilmaz H. Evaluation of glyceimic and oxidative/antioxidative status in the estradiol valerate-induced PCOS model of rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012 Jan;160(1):55-9.
- Duke CMP, Taylor HS. Stem cells and the reproductive system: Historical perspective and future directions. Review. *Maturitas* 76 (2013) 284– 289.
- Dyce PW, Wen L and Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(4): p. 384-90.
- Ekerhovd E, Brannstrom M, Alexandersson M, Norstrom A. Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum Reprod* 1997,12:301-305.
- Elçin YM. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies*, AEMB Series: 534, Kluwer-Plenum Press, New York & London. 2003.
- Elliot SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (4): 537-543 (2004).
- Erbas O, Pala HG, Pala EE, Oltulu F, Aktug H, Yavasoglu A, Taskiran D. Ovarian failure in diabetic rat model: nuclear factor-kappaB, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014 Dec;53(4):498-503.
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA. Fructose Might Contribute to the Hypoglycemic Effect of Honey. *Molecules* 2012, 17, 1900-1915.
- Erichsen MM, Lovas K, Skinningsrud B. Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: observations from a Norwegian registry. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009; 94: 4882–4890.
- Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Parks S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo

lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*, 54 (7): 1907-1913. (2005).

Fırat F. Yüksek lisans tez. Farklılaştırılmış Kök Hücre Uygulamalarının Over Hasarındaki Yeri. Celal Bayar Üniversitesi. 2013.

Forshee RA, Story ML, Allison DB. A critical examination of the evidence relating high fructose corn syrup and weight gain. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(6): 561-582. (2007).

Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JAJ, Ueki K and Kaneki M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54, 1340–1348. 2005.

Giudice LC. Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation.* 8 S26–S29. 2001.

Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer J. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod* 68:2164–2171. 2003.

Gordon CM. Functional hypothalamic amenorrhea. *New England Journal of Medicine* 2010; 263: 365–371.

Gözükaya C. Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) içeren içeceklerin insülin rezistansı üzerinden polikistik over sendromu (PKOS) ile ilişkisinin sıçan deneysel modeli ile incelenmesi. Yüksek lisans tez. 2013.

Gray C, Long S, Green C, Gardiner SM, Craigon J and Gardner DS. Maternal Fructose and/or Salt Intake and Reproductive Outcome in the Rat: Effects on Growth, Fertility, Sex Ratio, and Birth Order. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2013) 89(3):51.

Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, Lamarre J, and Petrik J. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flk-1/KDR, Are Cytoprotective in the Extravascular Compartment of the Ovarian Follicle.

Endocrinology 145(6):2896–2905. Copyright © 2004 by The Endocrine Society.

Gross LS, Li L, Ford ES, Simin L. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (5):774-779. (2004).

Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(4): 629-36.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 2001,7:801-819.

Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. 2005. *Nutr.Rev.*63,133–157.

Honnma H, Endo T, Henmi H, Nagasawa K, Baba T, Yamazaki K, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Saito T. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis.* 2006 Sep;11(9):1525-33.

Hubner K. Derivation of oocytes from Mouse embryonic stem cells. *Science,* 2003. 300(5623): p. 1251-6.

Jiang H, Sha S, Schacht J. The protein kinaseB/Akt signalling pathway in human malignancy. *J. Neurochem.,* 269-276. 2002.

Jones HF, Butler RN, Brooks DA. Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G202–G206.

Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 459–465.

Karaoğlu M. Yüksek fruktozlu mısır şurubu. *Gıda mühendisliği dergisi* 33.sayı. 2011:33-38.

Karaöz E, Ovalı E. *Kök Hücreler, Derya Kitapevi Celepler Matbaacılık,* (2004).

- Katz MG, Vollenhoven B. The reproductive endocrine consequences of anorexia nervosa. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 107707–713. 2000.
- Katznelson L, Kleinberg D, Vance ML. Hypogonadism in patients with acromegaly: data from the multi-centre acromegaly registry pilot study. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2001; 54: 183–188.
- Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *CARDIOLOGY RESEARCH AND PRACTICE* 2014: 943162.
- Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, Tasdemir N, Naz Sarac G, Delibasi T. Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty. *Gynecol Endocrinol.* 2014 Feb;30(2):135-40. Epub 2013 Dec 6.
- Koç ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Feb;27(3):235-9.
- Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine Reviews* 2010; 31: 702–755.
- Kyrou D, Kolibianakis EM, Fatemi HM, Tarlatzi TB, Devroey P, Tarlatzis BC. Increased live birth rates with GnRH agonist addition for luteal support in ICSI/IVF cycles: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 17 (6): 734–740. (2011).
- Lado-Abeal J, Rodriguez-Arno J, Newell-Price JDC. Menstrual abnormalities in Women with Cushing’s Disease are correlated with Hypercortisolemia rather than raised circulating androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; 83: 3083–3088.
- Lang SJ, Eberwein P, Reinshagen H, Reinhard T, Sundmacher R. Simultaneous transplantation of limbal stem cells may reduce recurrences of granular dystrophy after corneal transplantation: 2 long-term case reports. *Medicine (Baltimore).* 2015 May;94(20):e789.
- Laughlin MR. Normal Roles for Dietary Fructose in Carbohydrate Metabolism. Division of Diabetes, Endocrine and Metabolic Diseases, National Institute

of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Nutrients 2014.

- Lauritano D, Palmieri A, Vinci R, Azzi L, Taglabue A, Carinci F. Adipose derived stem cells: basic science fundamentals and clinical application. An update. *Minerva Stomatol.* 2014 Jul-Aug;63(7-8):273-81. Review.
- Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab. Care* 9,469–475. 2006.
- Le K-AA, Faeh D, Stettler R. Impact of four-week fructose overfeeding on insulin sensitivity, tissular lipids and plasma triglycerides in healthy men [abstract]. *Diabetologia* 2005; 48 (Suppl 1):A273.
- Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2000, 17:222-228.
- Levi B, Werman MJ. Long-Term Fructose Consumption Accelerates Glycation and Several Age-Related Variables in Male Rats. *Journal of nutrients* 1998:1442-49.
- Liu J, Zhang H, Zhang Y, Li N, Wen Y, Cao F, Ai H, Xue X. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells.* 2014 Dec 31;37(12):865-72.
- Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, Baracat MC, Silva-Sasso GR, Florencio-Silva R, Soares Jr JM, Baracat EC. Immunohistochemical evaluation of proliferation, apoptosis and steroidogenic enzymes in the ovary of rats with polycystic ovary. *Rev Assoc Med Bras.* 2014 Jul;60(4):349-56.
- Lowndes J, Sinnott S, Yu ZP and Rippe J. The Effects of Fructose-Containing Sugars on Weight, Body Composition and Cardiometabolic Risk Factors When Consumed at up to the 90th Percentile Population Consumption Level for Fructose *Nutrients* 2014, 6, 3153-3168.

- Maffei M, Halaas J, Ravussin E. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med* 1995;1:1155–61.
- Marletta MA, Olken NM. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry.*;32(37):9677-85. 1993 Sep 21.
- Melanson KJ, Angelopoulos TJ, Nguyen V. High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation. *Am J Clin Nutr* 2008;88(suppl):1738– 44.
- Melanson KJ, Zukley L, Lowndes J, Nguyen V, Angelopoulos TJ, Rippe JM. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin, and ghrelin and on appetite in normal-weight women. *Nutrition*. 2007 Feb;23(2):103-12.
- Memon MQ, Kumar A. The fructose mystery: how bad or good is it? *Pak J Pharm Sci*. 2013 Nov; 26 (6):1241-5.
- Meyts PD. The Insulin peptide family. FeF Chemicals A/S © 2012.
- Miao ZL, Guo L, Wang YX, Cui R, Yang N, Huang MQ, Qin WB, Chen J, Li HM, Wang ZN, Wei XC. The intervention effect of Rosiglitazone in ovarian fibrosis of PCOS rats. *Biomed Environ Sci*. 2012 Feb;25(1):46-52.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells, Minireview. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 226; 507-520. 2001.
- Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*;329: 11. (2002).
- Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):121-38.
- Nermoen I, Husebye E, Svartberg J. Subjective health status in men and women with congenital adrenal hyperplasia: a population-based survey in Norway. *European Journal of Endocrinology* 2010; 163: 453–459.

- Newell-Fugate AE, Taibl JN, Clark SG, Alloosh M, Sturek M and Krisher RL. Effects of Diet-Induced Obesity on Metabolic Parameters and Reproductive Function in Female Ossabaw Minipigs. *Comparative Medicine* Copyright 2014 by the American Association for Laboratory Animal Science.
- Ni XR, Sun ZJ, Hu GH, Wang RH. High concentration of insulin promotes apoptosis of primary cultured rat ovarian granulosa cells via its increase in extracellular HMGB1. *Reprod Sci.* 2014 Mar;22(3):271-7.
- Nojiri T, Kurano M, Tokuhara Y, Ohkubo S, Hara M, Ikeda H, Tsukamoto K, Yatomi Y. Modulation of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M levels in the plasma, liver and kidneys in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Diabetes Invest.* 5, 639–648. 2014.
- Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF, Ramakrishnan S. 1997. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Early Stage Ovarian Carcinoma. © 1997 American Cancer Society.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*;327:524-26. (1987).
- Parker K, Salas M, Nwosu V. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology* 2010; 5: 71-78.
- Paulsen F, Waschke J. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. 15th edition. 2011.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284(5417); 1168-1170. 1999.
- Petersen BE, Teroda N. Stem Cells: A Journey into a New Frontier. *J Am Soc Nephrol*, 12:1773-1780, 2001.
- Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*, 276(5309); 71-74. 1997.

- Rahavi H, Hashemi S, Soleimani M, Mohammadi J and Tajik N. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert In Vitro Immunomodulatory and Beta Cell Protective Functions in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice Model. Hindawi Publishing Corporation Journal of Diabetes Research. Volume 2015, Article ID 878535, 10 pages.
- Regnault TR, Gentili S, Sarr O, Toop CR, Sloboda DM. Fructose, pregnancy and later life impacts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Nov;40(11):824-37.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):409-14.
- Ribeiro JMC, Evans PM, MacSwain JL and Sauer J. Amblyomma americanum: Characterization of salivary prostaglandins E2 and F2alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp. Parasitol*. 74, 112-116. (1992).
- Roche S, Provansal M, Tiers L, Jorgensen C, Lehmann S. Proteomics of primary mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, 1(4); 511-517. 2006.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas*. 6th edition. 2011.
- Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ, Imthurn B. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod* 1996, 2:607-612.
- Rzeczynska IJ, Foyouzi N, Piotrowski PC, Celik-Ozenci C, Cress A, Duleba AJ. Antioxidants induce apoptosis of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*. 2011 Jan;84(1):162-6.
- Sadi G, Ergin V, Yilmaz G, Pektas MB, Yildirim OG, Menevse A and Akar F. High-fructose corn syrup-induced hepatic dysfunction in rats: improving effect of resveratrol. *European Journal of Nutrition* 2014:765.

- Salem HK and Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, vol. 28, no. 3, pp. 585–596, 2010.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund M, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest*, 109(10); 1291-1302. 2002.
- Selmani Z, Naji A, Gaiffe E. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation*, vol. 87, no. 9, pp. S62–S66, 2009.
- Shapiro A, Mu W, Roncal C. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. 2008; *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1370–R1375.
- Shawky N, Shehatou GSG, AbdelRahim M, Suddek G, Gameil NM. Levocetirizine ameliorates high fructose diet-induced insulin resistance, vascular dysfunction and hepatic steatosis in rats. *Cardiovascular pharmacology* © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.
- Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr* (2012) 51:445–454.
- Sherins RJ, Thorsell LP, Dorfmann A, Dennison-Lagos L, Calvo LP, Krysa L, Coulam CB, Schulman JD. Intracytoplasmic sperm injection facilitates pregnancies even in the most severe forms of male infertility. *Fertility and Sterility*, 1995.
- Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol Reprod* 67:1846–1852. 2002.
- Siasos G, Tousoulis D, Antoniadis C, Stefanadi E, Stefanadis C. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? *Journal of Endocrinological Investigation*, Volume 36, Issue 4, pp 221-226. (2013).

- Skalnikova HK. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 95 (2013) 2196e2211.
- Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer*. 2006 Jun;42(9):1257-72.
- Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, Yao Y. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jul 9;4(4):80.
- Sun SM and Empie MW. Fructose metabolism in humans – what isotopic tracer studies tell us. *Sun and Empie Nutrition & Metabolism* 2012, 9:89.
- Tappy L and Le KA. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity *Physiol Rev* 90: 23–46, 2010.
- Tejero J and Stuehr D. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. (2013).
- Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, Laurino C, Passos E, Paz AH, Cirne-Lima E. Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells Int*. 2014;2014:720753.
- Thiemmerman C. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in circulation shock. *Adv Pharmacol*;28:45-79. (1994).
- Tornheim K, Lowenstein JM. Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP, and citrate. *J Biol Chem* 251: 7322–7328, 1976.
- Tran LT, Yuen VG and McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol.Cell. Biochem*. 332,145–159. 2009.
- Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 447 (5): 480–9 (February 2004).
- Ullah I, Subbarao RB and Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* (2015) / 35 / art:e00191.

- Unuane D, Tournaye H, Velkeniers B, Poppe K. Endocrine disorders and female infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Volume 25, Issue 6, December 2011, Pages 861–873.
- Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, and Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. First Published Online: July 01, 2013.
- Van Voorhis BJ, Moore K, Strijbos PJ, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, and Weiner CP. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. *J Clin Invest.* 1995 Dec; 96(6): 2719–2726.
- Vardı N, Uçar M, Iraz M ve Öztürk F. Deneysel diyabetin sıçan endokrin pankreasında oluşturduğu morfolojik değişiklikler, *T Klin Tıp Bilimleri*, 23, 27-32 s. 2003.
- Webb R, Campbell B, Garverick H, Gong J, Gutierrez C, Armstrong D. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 53 33–48. 1999.
- Wei Y, Pagliassotti MJ. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH₂-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E926–E933.
- White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *Am J Clin Nutr* 2008;88(suppl):1716S–21S.
- Williams SN, Anthony ML, Brindle KM. Programmed cell death or apoptosis was induced in human promyelocytic leukemia. Volume 40, Issue 3, pages 411–420, September 1998.
- Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Duleba AJ. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. *Mol Hum Reprod.* 2010 Apr;16(4):251-9.
- Yaakov B. “A Western Diet Side Story”: The Effects of Transitioning to a Western-Type Diet on Fertility *Endocrinology.* 2014.

- Yang SH, Park MJ, Yoon IH. "Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 41, no. 5, pp. 315–324, 2009.
- Yılmaz DÖ, Akay HS, Ateş U, Özütemiz Ö, Baka M. Deneysel toksik siroz ve omentektomili siroz modellerinin sıçan ovaryum, fallop tüpleri ve uterusu etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine* 2012;51(3):175-181.
- Yu Z, Lowndes J, Rippe J. High-fructose corn syrup and sucrose have equivalent effects on energy-regulating hormones at normal human consumption levels. *Nutr Res.* 2013 Dec;33(12):1043-52.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon JD, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E and Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009* *Fertility and Sterility®* Vol. 92, No. 5, November 2009.
- Zhang J, Zhu G, Wang X, Xu B, Hu L. Apoptosis and expression of protein TRAIL in granulosa cells of rats with polycystic ovarian syndrome. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2007 Jun;27(3):311-4.
- Zhang JJ, Liu F. Tissue-Specific Insulin Signaling in the Regulation of Metabolism and Aging © 2014 International Union of Biochemistry and Molecular Biology.
- Zimmermann RC, Xiao E, Bohlen P, Ferin M. Administration of antivascular endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. *Endocrinology* 143:2496–2502. 2002.