



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRAUTERİN DÖNEMDE METFORMİN  
UYGULAMASININ YAVRU DIŞI SIÇANLARIN OVARYUM  
VE UTERUSUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Seda KIRMIZIKAN**

**Samsun  
Ocak-2015**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRAUTERİN DÖNEMDE METFORMİN  
UYGULAMASININ YAVRU DIŞI SIÇANLARIN OVARYUM  
VE UTERUSUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**


**Seda KIRMIZIKAN**


**Danışman  
Doç. Dr. Bülent AYAS**

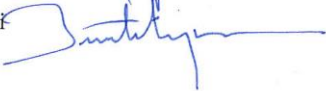
**Samsun  
Ocak-2015**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Seda KIRMIZIKAN tarafından Doç. Dr. Bülent AYAS Danışmanlığında hazırlanan "İntrauterin Dönemde Metformin Uygulamasının Yavru Dişi Sıçanların Ovaryum ve Uterusuna Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 23/01/2015 tarihinde yapılan sınav ile Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. B. Zuhale ALTUNKAYNAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi 

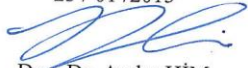
Üye : Doç. Dr. Bahattin AVCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi 

Üye : Doç. Dr. Bülent AYAS, Ondokuz Mayıs Üniversitesi 

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

23 / 01 / 2015

  
Doç. Dr. Aydın HİM

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, başta Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN olmak üzere,

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tezimin her aşamasında yanımda olan, örnek aldığım ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bülent AYAS'a, ve tüm hocalarıma,

Biyokimyasal analizimde yardımcı olan ve beni her daim güler yüzü ile karşılayan Sayın Doç. Dr. Bahattin AVCI'ya ve istatistiksel analizlerindeki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Yüksel TERZİ'ye,

Tez çalışması boyunca deneysel aşamaların uygulanmasında yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Sümeyye GÜMÜŞ UZUN'a, hoşgörü ve sabırla çevirilerimde yardımcı olan Araş. Gör. Adem KOCAMAN'a ve Yüksek Lisans Öğrencisi Ayşe KÖYLÜ'ye, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim Araş. Gör. Burcu DELİBAŞ'a, Araş. Gör. Gamze ALTUN'a, Araş. Gör. Ömür Gülsüm Deniz'e, Yüksek Lisans Öğrencileri Hülya AKBULUT'a, Ecem Nur ÖZTOP'a ve Gülay YILDIZ'a ve personelimiz Selahattin Esen'e,

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde görev yapmakta olan ve cerrahi işlemlerde beraber çalıştığım Sayın Mustafa İNCE'ye,

Yaşamımın her döneminde bana olan desteklerini esirgemeyen annem Şükriye KIRMIZIKAN'a, babam Ömer KIRMIZIKAN'a ve ablalarım Şennur ALTMIŞKARA, Hatice EREN'e, Eda İPEK'e, değerli arkadaşım Emre ATAN'a en içten gelen duygularıyla sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından (PYO. TIP. 1904.12.020) desteklemiştir.

## ÖZET

### İNTRAUTERİN DÖNEMDE METFORMİN UYGULAMASININ YAVRU DIŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE UTERUSUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Amaç:** Bu çalışmada, intrauterin dönemde farklı dozlardaki metforminin yavru sıçanların ovaryum ve uterusunda olası etkilerin incelenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada 9 adet gebe *Wistar albino* sıçandan elde edilen 15 adet yavru dişi sıçan kullanıldı. Gebe sıçanlardan 3 grup oluşturuldu. İlk gruba (kontrol grubu) serum fizyolojik, ikinci gruba (metformin 100 grubu) 100 mg/kg/gün doz olacak şekilde metformin, üçüncü gruba (metformin 200 grubu) ise 200 mg/kg/gün doz olacak şekilde metformin gavaj yolu ile verildi. İlaç uygulamaları tüm gruplar için gebeliğin 6.-15. günleri arasında gerçekleştirildi. Bu gruplardan elde edilen yavru sıçanlar postnatal 60. günde sakrifiye edilerek ovaryum ve uterus dokuları alındı. Ovaryum için; oosit sayısı, ovaryum, korteks, medulla ve follikül hacimleri, uterusda ise epitel ve endometriyum kalınlığı karşılaştırılarak değerlendirildi. Ayrıca yavru sıçanların ağırlıkları ve alınan kan örneklerinden serum östradiol değerleri de değerlendirildi.

**Bulgular:** Gruplar arasında ortalama vücut ağırlıkları, oosit sayısı, ovaryum, korteks, medulla, primer ve sekonder follikül hacimleri ve uterus epitel kalınlığı bakımından anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Ortalama tersiyer follikül hacmi, endometriyum kalınlığı ve östradiol seviyelerinin metformin 200 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0,05$ ).

**Sonuç:** Gebelikte yüksek doz metformin kullanımı yavru sıçanların östradiol sentezinde ve dolayısıyla endometriyum kalınlığı üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gebelik, metformin, sıçan, stereoloji, ovaryum, uterus

Seda KIRMIZIKAN, Yüksek Lisans Tezi  
Öndokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ocak-2015

**ABSTRACT**  
**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF METFORMIN TREATMENT ON  
THE OVARIES AND UTERUS OF THE FEMALE RAT PUPS DURING  
INTRAUTERINE PERIOD**

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effect of metformin treatment at the different dosage levels on the ovaries and uterus of the rat pups in the course of intrauterine period.

**Material and Method:** Fifteen female *Wistar albino* rat pups were used. Three groups were formed from the pregnant rats. Saline was given to the first group utilized as a control group, the second one was administrated as Metformin 100 group which was given 100 mg/kg/day of metformin and the third group given 200 mg/kg/day of metformin was labeled as Metformin 200. The drug administration was performed to the rats orally by gavage during 6-15 days of gestation. The pups obtained from the groups were sacrificed in the day of postnatal 60 and then their ovaries and uterine were taken. The number of oocytes, the volumes of ovarian cortex, medulla, follicles and the epithelium and endometrial thickness of uterus were evaluated. In addition, the estradiol levels in blood samples and weight of the pups were also compared.

**Results:** There were no significant differences between groups for the number of oocytes, the volumes of ovarian cortex, medulla, primary and secondary follicles and for the uterine epithelium thickness ( $p>0.05$ ). The average volume of tertiary follicles, the uterine endometrial thickness, and the estradiol levels were significantly decreased for metformin 200 group when compared to the control group ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** It might be concluded that gestational exposure to high dose metformin may cause negative effects on estradiol production and subsequently on the endometrial thickness of offspring rats.

**Keywords:** Metformin, ovary, rat, pregnancy, stereology, uterus

**Seda KIRMIZIKAN, Master Thesis  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, January-2015**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ACC</b>	Asetil karboksilaz
<b>AMPK</b>	5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>CYP17</b>	17a-hidroksilaz 17,20-liyaz
<b>CYP11A</b>	Cholesterol side-chain cleavage
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Komisyonu
<b>FSH</b>	Folikül uyarıcı hormon
<b>GnRH</b>	Gonotropin salgılatıcı hormon
<b>HSD3B</b>	3b-hidrosisteroid dehidrojenaz
<b>LH</b>	Lüteinleştirici hormon
<b>LHr</b>	Lüteinleştirici hormon reseptörü
<b>P</b>	Postnatal
<b>PAI-1</b>	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
<b>PKOS</b>	Polikistik over sendromu
<b>SHGB</b>	Seks hormon bağlayıcı globülin
<b>StAR</b>	Steroidogenic acute regulatory protein.
<b>SRÖ</b>	Sistemik rastgele örnekleme
<b>T2D</b>	Tip 2 diyabet
<b>Zona pellusida</b>	ZP

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Metformin .....	3
2.1.1. Tarihçesi .....	3
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri .....	4
2.1.3. Etki Mekanizması.....	4
2.1.4. Metformin ve Diyabet .....	5
2.1.5. Metforminin Üreme Sistemine Etkisi.....	7
2.1.6. Metforminin Gebelikte Kullanımı .....	9
2.2. Kadın Üreme Sistemi.....	11
2.2.1. Ovaryum Histolojisi .....	12
2.2.2. Follikül Gelişimi.....	14
2.2.3. Ovulasyon.....	17
2.2.4. Menstrüel Siklus .....	18
2.2.5. Uterus Histolojisi.....	20
2.3. Dişi Sıçanların Genital Özellikleri.....	21
2.3.1. Sıçanlarda Gebelik ve Doğum.....	22
2.3.2. Sıçanlarda Östrus Siklus.....	22
2.4. Stereoloji.....	26
2.4.1. Sistematik Rastgele Örnekleme.....	26
2.4.2. Üç Boyutlu Ortamda Sayım: Disektör .....	27
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	30
3.1. Deney Hayvanları.....	30
3.2. İlacın Temini ve Hazırlanması .....	31
3.3. Histolojik İşlemler.....	31



3.3.1. Perfüzyon ve Tespit İşlemleri.....	31
3.3.2. Doku Takibi.....	31
3.3.3. Kesit Alma.....	31
3.3.4. Boya İşlemleri .....	33
3.4. Biyokimyasal Analiz.....	34
3.4.1. Serum Östradiol Seviyesinin Ölçümü .....	34
3.4.2. Deneysel İşlemler .....	34
3.5. Stereolojik İşlemler .....	35
3.5.1. Fiziksel Disektör ve Oosit Sayımı .....	36
3.5.2. Ovaryum ve Folliküllerin Hacim Ölçümü.....	38
3.6. İstatistiksel Analiz ve Hata Katsayısının Bulunması .....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
4.1. Gruplardaki Deneklerin Ovaryumuna Ait Genel Yapısal Bulgular.....	42
4.1.1. Oosit sayısına Ait Bulgular .....	47
4.1.2. Ovaryum, Korteks, Medulla Hacimlerine Ait Bulgular .....	49
4.1.3. Follikül Hacimlerine Ait Bulgular.....	52
4.2. Gruplardaki Deneklerin Uterusuna Ait Genel Yapısal Bulgular .....	55
4.2.1. Endometriyum Kalınlıklarına Ait Bulgular.....	56
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	58
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>60</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>65</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>66</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>74</b>

## 1.GİRİŞ

Günümüzde modernleşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde değişen yaşam koşulları ve beslenme alışkanlıkları ile birlikte birçok sağlık sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu sağlık sorunlarından biri de T2D'dir (tip 2 diyabet) ve çağımızda görülen sağlık problemlerinin başında gelmekle birlikte prevalansıda gün geçtikçe artmaktadır. T2D patogenezinin temelinde insülin direnci yer almaktadır ve tedavisi için insülin hassaslaştırıcı ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Metformin, T2D tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve hastalığın gelişme riskini azaltmakta etkili bir insülin hassaslaştırıcı ajandır (Witters, 2001; Harmancı ve ark., 2005).

Metforminin yaygın olarak kullanıldığı durumlardan biride PKOS'dur (polikistik over sendromu). Üreme çağındaki bayanların yaklaşık %5-7'si PKOS'ludur (Sabatini ve ark., 2011). Bu bayanların %50-70'nin insülin direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Bayrak ve ark., 2007). İnsülin direncine bağlı olarak ortaya çıkan hiperinsülinemi, üreme sistemi üzerinde ovulasyon bozukluğu, endometriyal hiperplazi, endometriyozis, endometriyal kanser gibi hastalıklar ve erken gebelik kaybına neden olmaktadır (Sabatani ve ark., 2011; Gülaç, 2012). İnsülin direncinin bu olumsuz etkileri dikkate alındığında insülin hassaslaştırıcı ajanlarla tedavi son yıllarda giderek artmaktadır. Bir insülin hassaslaştırıcı olan metformin bilinen eski bir ilaç olmasına rağmen yapılan çalışmalar arttıkça kullanım alanları da giderek artmaktadır (Harmancı ve Gürlek, 2005).

Metforminin steroid üretimi üzerine doğrudan etkisi bulunmaktadır (Mansfield ve ark., 2003). Yetişkin üreme dokularında yapılan çalışmalarda aromataz aktivesinde inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Takemura ve ark., 2006; Oner ve ark., 2011). Ovaryum ve endometriyumun aromataz aktivitesine sahip olduğu göz önüne alındığında metforminin bu yapılardaki etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda bu maddenin endometriyum üzerine antiproliferatif etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu duruma, aromataz aktivitesinin baskılanmasının neden olduğu ileri sürülmüştür (Oner ve ark., 2011). Bu etken maddenin ayrıca, granuloza hücrelerinde FSH'nın (follikül uyarıcı hormon) indüksiyonuna bağlı olarak sentezlenen östradiol ve progesteron üretimini baskıladığı bildirilmiştir (Mansfield ve ark., 2003; Oner ve ark., 2010). Doza bağlı olarak da teka hücrelerinde androstenedion üretimini yavaşlattığı ileri sürülmüştür (Mansfield ve ark., 2003).

Metformin plasentadan geçebilen bir maddedir. Bu nedenle bahsedilen etkilerin fetüste de görülmesi olasıdır. Günümüzde insanlarda gebeliğin 8-12. haftalarına kadar kullanılabilmesi ileri sürülmüştür (Simmons, 2010). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda metforminin gebelikteki kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilecek muhtemel komplikasyonlar aydınlatılmaya çalışılmıştır (Hellmuth ve ark., 2000; Nilcholson ve ark., 2009). Bu çalışmaların çoğunda özellikle ilk trimesterde insülinin yerine kullanılabilmesi vurgulanmıştır (Rowan ve ark., 2008). Her ne kadar gebelikte kullanılan metforminin konjenital malformasyonlar ve fetal gelişim geriliği bakımından güvenli olduğu klinik çalışmalarda ortaya konmuşsa da, bu ilacın intrauterin uygulamalarında yavru ovaryum ve uterus dokularındaki etkileri hala sorgulanmamıştır. Metforminin steroid sentezine olası etkisi göz önüne alındığında (progesteron, östradiol ve androstenedion sentezini baskılaması gibi) yavru genital yapılarda da muhtemel etkisinin olabileceği akla gelmektedir. Bu çalışma ile metforminin farklı doz seviyelerindeki intrauterin uygulamalarında, yavru ovaryum ve uterus dokularındaki muhtemel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, yapılan çalışmanın ilgili literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Metformin

#### 2.1.1. Tarihçesi

Metformin (1,1- dimetil biguanid hidroklorid) T2D tedavisinde hastalar tarafından yaygın olarak kullanılan bigunidin grubu bir ilaçtır. İlaç '*Galega officinalis*' diğer adıyla 'Fransız leylağı' olarak bilinen bitkinin özlerinden elde edilmektedir (Şekil 1). *Galega officinalis* bitkisinin T2D tedavisi ile ilgili yapılan ilk çalışmalar ortaçağ döneminde Avrupa'da 'guanidin' yapısının bulunmasıyla başlamıştır. Daha sonraları guanidinin oldukça toksik olduğu anlaşılmış ve 1950'li yıllarda biguanidin (bağlanmış halde iki guanidin halkası) haline getirilerek fenformin, buformin ve metformin adlı üç biguanid grubu diyabetli hastalar için kullanıma sunulmuştur (Şekil 2). 1960 yılında oldukça popüler hale gelen fenformin ve buformin yüksek laktik asidoz etkisi ve artan kardiyak ölümler nedeniyle 1970'li yılların başında kullanımdan kaldırılmıştır. Grubun diğer temsilcisi olan metformin daha az lipofilik olup çok daha düşük laktik asidoz riskine sahiptir ve güvenirliliği tüm dünyada kanıtlanmıştır (Witters, 2001; Mahmood ve ark., 2013).

Metformin 1958 yılında İngiltere, 1972 yılında Canada, 1995 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca PKOS tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Metforminin antiviral ve antikanser tedavisinde kullanılması için araştırmalar yapılmaktadır (Ben Sahra ve ark., 2010; Martin-Castillo ve ark., 2010).



Şekil 1. *Galega officinalis* (Bailey ve Day, 2004)

Biguanide	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \text{NH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$
Metformin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH} \quad \text{NH} \\ \diagup \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Phenformin	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - (\text{CH}_2)_2 \quad \text{NH} \quad \text{NH} \\ \diagup \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$
Buformin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_3 \quad \text{NH} \quad \text{NH} \\ \diagup \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$

Şekil 2. Biguanidin, metformin, fenformin, buforminin kimyasal yapısı (Bailey ve Day, 2004)

### 2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

Farmakolojik bir ajan olarak metforminin biyoyararlanımı %50-60 olup, proteinlere fazla bağlanamamaktadır. Önemli bir kısmı ince bağırsakta birikmek üzere geniş bir dağılım hacmine sahiptir. Metformin karaciğerde metabolize edilememektedir, değişmemiş halde böbreklerden aktif tübüler sekresyon ile vücuttan atılmaktadır. Renal fonksiyonlar bozulduğunda vücutta birikmektedir. Bu yüzden böbrek yetersizliği olan hastalarda metformin dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır. Renal fonksiyon bozukluğu olmayan hastalarda yarılanma ömrü yaklaşık 5 saat olarak gösterilmiştir. Dokuların çoğunda periferik plazmadakine benzer konsantrasyondadır. Karaciğer ve böbreklerde ise daha yüksek konsantrasyonlarda dağılmakta olup, en yüksek tükürük bezleri ve intestinal duvarda olmaktadır (Scheen, 1996; Harmancı ve ark., 2005; Timmins ve ark., 2005).

### 2.1.3. Etki Mekanizması

Metforminin temel etkisi hepatik glukoz üretimini ve intestinal glukozun geri alınımını azaltmak ayrıca periferik insülin duyarlılığını artırarak hiperglisemiyi düzeltmektedir. Bu etkilerin yanı sıra metforminin hepatik glukoneojenezi inhibe ettiği bilinmektedir (Elnashar, 2011).

Metforminin moleküler hedefi yıllar boyunca anlaşılamamıştır, pleiotropic etkisinin AMPK (5'Adenosine monophosphate-activated protein kinase) ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir (Viollet ve ark., 2012). AMPK vücudun enerji dengesi

üzerinde önemli bir rol oynayan enzimdir. Metformin karbonhidrat ve lipit mekanizması üzerinden insülin sinyalini etkileyerek AMPK'yı aktive etmektedir (Mahmood ve ark., 2013). AMPK aynı zamanda yağ asidi, protein ve kolesterol sentezi gibi metabolik yolların modülasyonunu sağlamakta, hücre içine glukoz taşımakta ve karaciğer ile iskelet kaslarında glukoz mekanizmasında rol oynamaktadır (Ucbek, 2012). Yapılan çalışmalarda metforminin AMPK'yı aktive ederek hepatosit mitokondrilerinde solunum zincirindeki kompleks-1'i inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Zhou ve ark., 2001; Mahmood ve ark., 2013). Metforminin hücre sel solunum inhibisyonu sonucunda glukoneogenezi azalttığı görülmüştür (Elbert ve ark., 1995). Ayrıca metformin AMPK yolu üzerinden lipogenik enzim ACC (asetil karboksilaz) aktivesi ile lipogenezi azaltmakta ve yağ asit oksidasyonunu arttırmaktadır (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010).

Sıçan hepatositlerinde yapılan çalışmalarda metformin, ATP (adenozin trifosfat) konsantrasyonu ve piruvat kinazın allosterik inhibitörünü azalttığı gözlenmiştir. Böylece piruvat kinazın akışı artarken hepatik glukoz üretimi azalmaktadır (Argaud ve ark., 1993; Kirpichnikov ve ark., 2002).

Yine sıçanlar ile yapılan çalışmalarda AMPK'ın alt birimlerinin ovaryumda (oosit, corpus luteum, granuloza, teka) bol miktarda sentezlendiği görülmüştür. AMPK ovaryum fonksiyonuna etki etmek ile birlikte metforminin over dokusu üzerine olan etkisini düzenlemektedir. Bunların dışında metforminin ovaryum üzerinde yapılan çalışmalarında AMPK aktivasyonu ile steroid üretimini düşürmekte, hiperandrojenizmi azaltmakta ve ovaryumdaki antitoksidan savunmanın artmasını sağlamaktadır (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010).

#### **2.1.4. Metformin ve Diyabet**

T2D tüm dünyada diyabet vakalarının %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. T2D hastalarının çoğunda iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer düzeyinde tespit edilen insülin direnci bulunmaktadır. İskelet kasında görülen insülin direnci azalmış periferik glukoz kullanımı ile sonuçlanırken, yağ dokusu ve karaciğerde görülen insülin direnci artmış hepatik glikoz üretimi yapmaktadır. T2D artmış pankreas insülin sekresyonu ve insülin direnci ile başlamaktadır. İnsülinin perifer dokulardaki duyarsızlığı hiperinsülinemiye neden olmaktadır. Zamanla hastalık ilerledikçe pankreas adacık hücre fonksiyonu duraksamaya başlamakta ve bunun sonucunda insülin seviyeleri ihtiyaca

yetişemez ve böylelikle hiperglisemi ortaya çıkmaktadır (Inzucchi, 2009; Lautatzis ve ark., 2013).

T2D hastalarında obezite, hipertansiyon, yüksek trigliserid, endotelial disfonksiyon, prematüre kardiyavasküler morbidite için artmış risk görülmektedir. Bu bulguların toplamına sıklıkla 'metabolik sendrom' denilmektedir. İnsülin direnci bu kompleksin kökenindeki sebep gibi kabul edilmektedir ve bu nedenle 'insülin direnci sendromu' da denilebilmektedir (Inzucchi, 2009).

Metformin T2D tedavisinde ilk tercih edilen ilaçlardan biridir. Yapılan çalışmalarda metformin kan glukoz seviyesini hipoglisemiye sebep olmadan düşürdüğü görülmüştür. Bu nedenle metformin antihiperglisemik madde olarak kabul edilmektedir. Metformin ayrıca plazmadaki insülin seviyesini önemli derecede düşürdüğü için insüline karşı hassaslaştırıcı özelliği de bulunmaktadır (Viollet ve ark., 2012; Elia ve ark., 2013).

Vücudumuzda bulunan serbest yağ asitleri diyabet ile birlikte artmaktadır ve bu artış hepatic glukoz üretiminde artışa bununla birlikte insülin direncine sebep olmaktadır. Metformin serbest yağ asitlerini %10-30 oranında azalttığı görülmüştür. Böylece hepatic glukoz üretimi düşmekte ve insülin hassiyeti oluşmaktadır. Serbest yağ asitlerinin azalmasıyla metformin sadece insülin hassasiyetinde rol oynamaz aynı zamanda pankreastaki beta hücreleri tarafından salgılanan insülini de düzeltmektedir (Kirpichnikov ve ark., 2002).

Metformin glukoneogenik enzimler olan glukoz 6-fosfataz, fruktoz 1,6 bifosfataz, fosfoenolpiruvat karboksilaz enzimlerini inhibe ederek hepatic glukoz üretimini azalttığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra metformin glikolitik enzimleri (hekzokinaz, glukokinaz ve piruvat kinaz) aktive ederek glikolizi uyarmaktadır (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010).

T2D'de metformin plazma glukoz seviyesini azaltmasının dışında kan basıncı, plazma kolesterol ve trigliserid düzeyleri üzerinde yararlı etkisinin olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda metformin tedavisinin diyastolik ve sistolik kan basınçlarını, plazma trigliserid ve total kolesterol düzeyini azalttığı bulunmuştur. Metformin diyabet tedavisinde tek başına kullanılabileceği gibi sülfonilurelar, insülin glikozidaz inhibitörleri, tiazolidinedionlar, sülfonilürea gibi ilaçlar ile birlikte kullanılabilirler (Mather ve ark., 2001; Harmancı ve ark., 2005).

### 2.1.5. Metforminin Üreme Sistemine Etkisi

Metforminin üreme sistemi üzerinde yapılan çalışmalarda aromataz aktivitesi üzerinde inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir. Aromataz, östrojen biyosentezi için temel bir enzimdir. Östrojeni ve testosteronu östradiole katalizlemektedir. İnsan ovaryum ve endometriyum stroma hücreleri aromataz aktivitesine sahiptir, dolayısıyla metforminin bu yapılardaki ilgili etkiyi göstermesi mümkün gözükmemektedir (Oner ve ark., 2011).

Metforminin yaygın halde kullanıldığı durumlardan biri de PKOS'dur. PKOS üreme çağındaki bayanların %5-7'sini etkileyen endokrin bir bozukluktur. Hastalığın etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte PKOS'lu bayanlar menstrual düzensizlik, anovulasyon, hiperandrojenizme bağlı infertilite ile karakterizedir. Bunların yanı sıra PKOS'lu bayanlarda düşük riskinde artış görülmektedir (Liu ve ark., 2006; Genazzani ve ark., 2012). İnsülin direncine bağlı hipergliseminde PKOS hastalığının patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Bayrak ve ark., 2007).

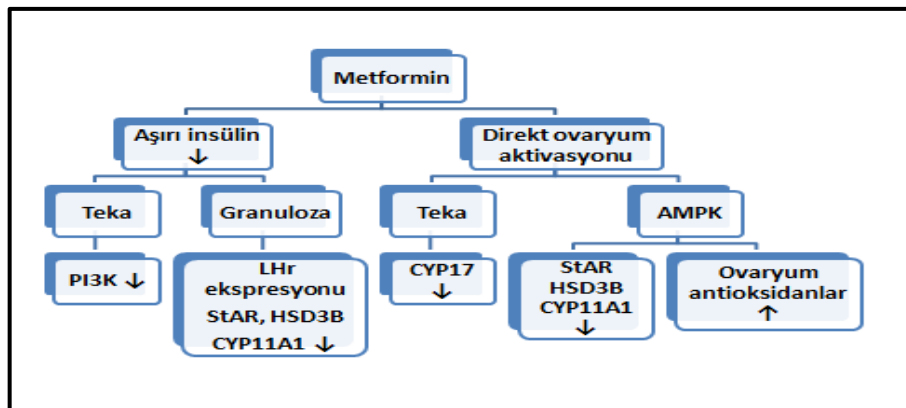
PKOS'nda hipotalamus-hipofiz-over aksı normal fonksiyonunu gerçekleştirememektedir. Serum LH (lüteinleştirici hormon) konsantrasyonu artmıştır. LH konsantrasyonundaki artışın sebebi GnRH (gonotropin salgılatıcı hormon) salınımının artmasından ve yüksek östrojen düzeylerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca PKOS'lu bayanların %65-70'inde görülen insülin direnci de LH konsantrasyonunun artmasına sebep olmaktadır. Artan LH seviyesi androjen üretimini artırmakta ve böylece androjen seviyeleri artmaktadır. Bununla birlikte insülin direnci SHGB (seks hormon bağlayıcı globülin) üretiminde azalmaya ve bu azalmaya bağlı olarak serbest testosteron düzeyini arttırmaktadır. Bu durum hiperandrojenizme yol açmaktadır. İnsülin direnci ovaryan ve adrenal androjen biyosentezinin anahtar enzimi olan CYP17'nin (17a-hidroksilaz 17,20 – liyaz) aşırı aktivesiyle ilişkili olabileceği ve bu enzimin hiperandrojenizme yol açabileceği düşünülmektedir (Kaya ve Desdicioğlu, 2012). Artan LH düzeylerinin bir diğer olumsuz etkisi ise ovaryumda bulunan folliküllerde cAMP (siklik adenzin monofosfat) düzeylerini arttırmasıdır. Yüksek seviyedeki cAMP granuloza hücrelerinde steroidogenezi arttırmakta ve ovulasyon öncesi olması gereken maturasyon bu dönemde olmamaktadır (Oner, 2011).

PKOS'lu hastalarda artan LH seviyelerine karşı azalmış FSH seviyeleri görülmektedir (Kaya ve Desdicioğlu, 2012). LH seviyesinin, FSH'a göre düşük olması,



ovaryumdan öncelikle androjen sentezini arttırmaktadır. Bu durum hiperandrojenizm ile sonuçlanmaktadır (Özsan, 2011). Androjenler ise beyinde ve ovaryumda aromatize olarak östrojene dönüşmektedir. Artmış östrojen ise FSH salınımını baskılamaktadır. PKOS’nda FSH salınımının bozulması ve tam anlamıyla siklus başındaki düzeyine ulaşamaması nedeniyle sürekli olarak yeni follikül büyümesi gerçekleşmemekte ve ovulasyon olmamaktadır (Kaya ve Desdicioğlu, 2012). Aromataz inhibitörleri ovaryumda ve beyinde östrojen üretimini düşürmekte, böylece FSH salınımını artırarak, follikül stimülasyonu ve ovulasyonunu sağlamaktadır (Oner, 2011).

PKOS’lu hastaların büyük bir yüzdesinin insülin direncine sahip olmasından dolayı metformin gibi insülin hassaslaştırıcı ilaçlar kullanılmaktadır (Hawthorne, 2006; Genazzani ve ark., 2012). Metformin PKOS’lu bayanlara iki şekilde etki etmektedir. Doğrudan ovaryumu etkileyerek teka hücrelerinde CYP17’nin salınımını azaltır ve granuloza hücrelerinden AMPK yolu ile insülinin uyarıcı etki yaptığı CYP11A (cholesterol side-chain cleavage), HSD3B (3b-hidrosisteroid dehidrojenaz), StAR (steroidogenic acute regulatory protein) gibi steroidojenik enzimlerin aktivitesini azaltmakta ve ovaryum antioksidan savunmasını arttırmaktadır. Diğer etkisi ise insülin seviyesini azaltarak teka hücrelerinde PI3K (fosfoinoside 3-chinasi) ve granuloza hücrelerinde LHR’nü (lütienleştirici hormon reseptörü), StAR, HSD3B, CYP11A enzimlerinin aktivitesini azaltmasıdır (Nestler ve Jakubowichz 1996; Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010; Şekil 3). Bunların yanı sıra metforminin insülin tarafından uyarılan östradiol ve progesteron üretimini baskıladığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Malsfield ve ark., 2003; Oner ve ark., 2010).



Şekil 3. Metforminin PKOS’lu hastalarda etkisi (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2010’dan uyarlanmıştır)

Uzun dönem metformin kullanımı LH ve FSH seviyelerini normal seviyelerine getirmekte, SHGB'ni arttırmakta, serbest ve total testosteron seviyelerini azaltmakta, ovulasyonu arttırmakta, menstrual siklusu düzenlemekte ve aşırı androjen seviyesini düşürme yönünde tedavi edicidir. Böylece artan androjen seviyesi düşmekte ve doğurganlık oranında artış sağlamaktadır (Vandermolen ve ark., 2001; Lergo ve ark., 2007; Sabatini ve ark., 2011).

Metformin bu etkilerin dışında endometriyozis, endometrial hiperplazi ve endometriyal kanser tedavilerinde kullanılmaktadır (Oner ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda metforminin endometriyal bezler üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu gösterilmiştir. Metformin hem ovarian hem de lokal östrojen üretimini baskılayarak endometriyozisi inhibe etmektedir. Metformin endometriyoziste doza bağlı olarak cAMP- uyarılmış aromataz aktivitesini azaltmaktadır (Gülaç, 2012). Metformin ile yapılan sıçan çalışmasında endometrial hücrelere karşı moleküler düzeyde proliferasyonu durdurduğu ve endometriyal hiperplaziyi geriletliği gösterilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise metforminin PKOS'lu hastalarda hiperinsülineminin neden olduğu aromataz enzim ve östrojen artması ile oluşan endometrial hiperplazileri ve kanseri önlediği gösterilmiştir (Oner ve ark., 2011).

### **2.1.6. Metforminin Gebelikte Kullanımı**

Gebelik boyunca annenin maruz kaldığı fiziksel ve kimyasal etmenlerin doğrudan veya dolaylı olarak intrauterin gelişim üzerine etkileri mevcuttur. Bu dönemdeki ilaç kullanımı, üzerinde durulması gereken önemli etmenlerdendir. Özellikle gebeliğin ilk 9 haftasını kapsayan embriyonel dönem, organogenezin geliştiği ve embriyonun teratojenik etkilere karşı çok hassas olduğu bir dönemdir. Belirli ve güçlü teratojenler yanında pek çok ilaçların bu dönemde özellikle majör malformasyonlara, konjetinal anomalilere ve işlevsel bozukluklara neden olduğu bilinmektedir (Berkan, 1990). Bu nedenle gebelik boyunca kullanılması zorunlu ilaçların gelişmekte olan fetüsün sağlığı açısından taşıdığı riskler göz önünde bulundurulmalıdır.

İlacın doğrudan fetüsü etkileyebilmesi için plasentadan geçebilmesi gerekmektedir. Plasenta gebeliğin 5. haftasından itibaren anne ile fetüs arasındaki madde alışverişlerinde bütünüyle görev yapmaktadır. Diğer biyolojik membranlarda olduğu gibi ilaçların plasentadan geçişleri yağda çözünürlüğüne ve iyonizasyon derecelerine bağlıdır. Lipofilik ilaçlar plasentadan hızlıca yayılma ve fetal dolaşıma

katılmaya eğilimliyken yüksek derecede iyonize ilaçlar plasentadan yavaş bir şekilde geçmekte ve fetüste düşük konsantrasyonlarda bulunabilmektedir (Ceviz, 2008).

Gebelikte ilaç kullanımı FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Komisyonu) kriterlerine göre Tablo 1’de verilmiştir. Bu kriterlere göre metforminin gebelikte kategorisi B’dir. Yapılan çalışmalarda metforminin plasentadan geçtiği belirlenmiştir. Sıçan ve tavşanların vücut yüzeyi hesap edilerek yapılan çalışmalarda metforminin 600 mg/kg/gün’e kadar olan dozlarının teratojenik ve embriyotoksik olmadığı gösterilmiştir. İnsanlarda günlük önerilen maksimum dozu yaklaşık 200 mg’dır (Glueck ve ark., 1999; Erkekoglu ve ark., 2008).

**Tablo 1.** FDA’ya göre ilaçların kullanım kategorisi (İskit, 2007’den uyarlanmıştır)

<b>Kategori</b>	<b>Açıklama</b>
A	Gebelerde en güvenilir ilaçtır. Kontrollü çalışmalarda bu ilacın fetüse zararı olduğu gösterilmemiştir.
B	Deney hayvanlarında teratojenik etki göstermemişse de gebe kadınlarda yapılmış kontrollü çalışmalar eksiktir ya da deney hayvanlarında teratojen etki gösterilmiş ancak gebe kadınlarda yapılan kontrollü çalışmalarda bu etki doğrulanmamıştır. Gerekliyse bu kategorideki ilaçlar rahatlıkla kullanılabilir.
C	Deney hayvanlarında teratojen etki gösterilmiştir, ancak gebe kadınlarda yapılan klinik deneyim yetersizdir ya da gebe kadınlarda ve deney hayvanlarında ilaç incelenmemiştir. Bu kategorideki ilaçlar potansiyel riski karşılayacak terapötik yarar öngörülüyorsa kullanılabilir.
D	Bu kategorideki ilacın insan fetüs üzerindeki zararlı etkisi kanıtlanmıştır. Ancak gebe terapötik yararı fetüste beklenen zararından fazla ise ve yaşam tehdit eden bir durumun tedavisinde alternatifsiz olarak kullanılması zorunlu ise yaratabileceği olası riskler anne adayına detaylı anlatılarak kullanılabilir.
X	Deney hayvanları ve gebelerde incelemeler, ilacın fetüse zararını kesin olarak göstermiştir. Gebelerde terapötik yararı fetüse olan zararına göre ihmal edilebilir. Bu kategorideki ilaçlar gebelerde ve gebe kalma olasılığı bulunanlarda hiçbir şekilde kullanılamaz.

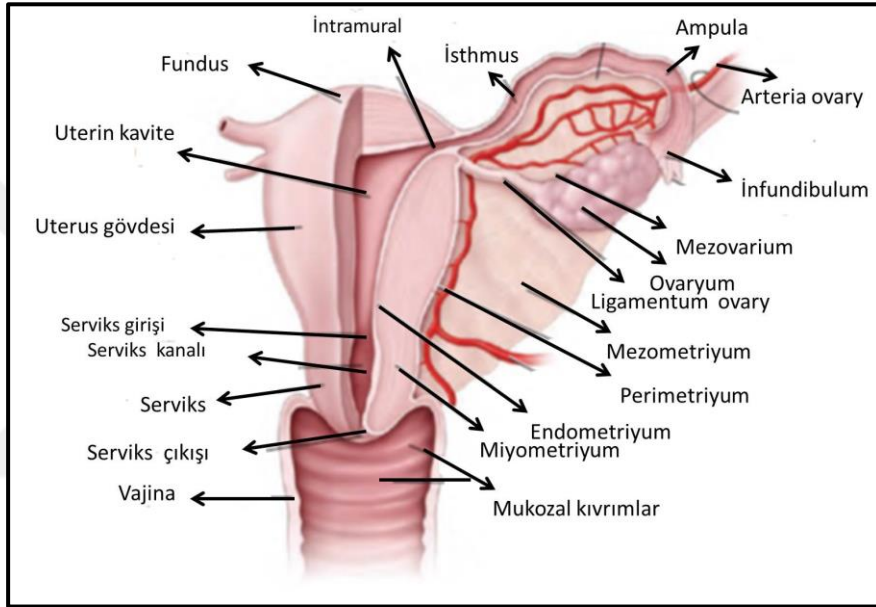
T2D ve PKOS'nda görülen insülin direnci ve normal olmayan glukoz kan düzeylerinin gebelikte fetüste kojenital anomalilere neden olduğu bildirilmektedir. Bunların yanı sıra özellikle PKOS'lu bayanlarda insülin direnci ve artan hiperinsülinemi ile erken düşüklere neden olmaktadır. PKOS'da artan düşük oranı ile insülin direnci arasındaki ilişki için potansiyel mekanizma plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) düzeylerinin artışı ve glikolidin A seviyelerinin azalması olarak gösterilmiştir. Gebelik sırasında artan PAI-1 seviyesinin, plasental yetmezlik ve tromboza neden olduğu düşünülmektedir. Glikolidin A ise embriyo implantasyonunu kolaylaştıran, luteal faz sırasında endometrial bezler tarafından üretilen bir glikoproteindir. Bu nedenle azalmış glikolidin A düzeylerinin PKOS ile ilgili erken gebelik kayıplarının patojeninde bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (De Leo ve ark., 2003; Lılja ve Mathiesen, 2006). Metformin ile tedavi edilen hastalarda PAI-1 seviyesinin azalması ve glikolidin A seviyesinin artması ile erken düşük oranlarının azaldığı görülmüştür. Metforminin gebe bayanlar üzerindeki diğer bir önemi ise uteral spiral arterlerin direnç indeksinde meydana getirdiği belirgin azalmadır. Meydana gelen azalma sonucunda embriyonun uterusu tutunması kolaylaşır ve böylece gebeliğin devamı sağlanabilmektedir (Jakubowicz ve ark., 2001; Erkekoğlu ve ark., 2008).

İnsülin dirençli bayanların yüksek riskli gebeliklere eğilimli oldukları görülmektedir. İnsülin direncinin gebelik fizyolojisindeki olumsuz etkileri göz önüne alınırsa metformin tedavisine devam edilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Literatürde metforminin gebelikte bu gibi durumlarda 8-12. haftalara kadar kullanılmasının faydalı olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur (Simmons, 2010; Kumar ve Khan, 2012).

## **2.2. Kadın Üreme Sistemi**

Kadın üreme sistemi oogenez ile gametlerin oluşmasından, fertilizasyon ve fetüsün gelişimi için uygun ortam hazırlamasından sorumlu çok yönlü bir sistemdir. Kadın üreme sistemi iç ve dış organlar olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. İç genital organlar; ovaryum, tuba uterina, uterus ve vajinadan oluşmaktadırlar (Şekil 4). Dış genital organlar ise mons pubis, minör klitoris, vestibül, labia majör ve labia minörden oluşmaktadır.

Kadın üreme sistemine ait organlar çocukluk, puberte ve yaşlılık döneminde histolojik ve fonksiyonel olarak birtakım değişikliklere uğramaktadırlar. Pubertede menstrüel siklusun başlaması (9-14 yaş) ile birlikte hormonların etkisiyle iç genital organlarda bir aylık periyotlarla tekrarlayan değişimler yaşanmaktadır. Bu süreç sonucunda ovaryumlardan olgun bir veya iki oosit üretilerek döllenmesi için tuba uterinaya taşınmaktadır. Menopoz (45-55 yaş) ile birlikte menstrüel siklusun sonlanması ile birlikte ovaryumlar oosit üretme fonksiyonlarını kaybetmektedirler (Ross ve Pawlina, 2011).



Şekil 4. Dişi genital sistemde iç üreme organları (Ross ve Pawlina, 2011'dan uyarlanmıştır)

### 2.2.1. Ovaryum Histoloji

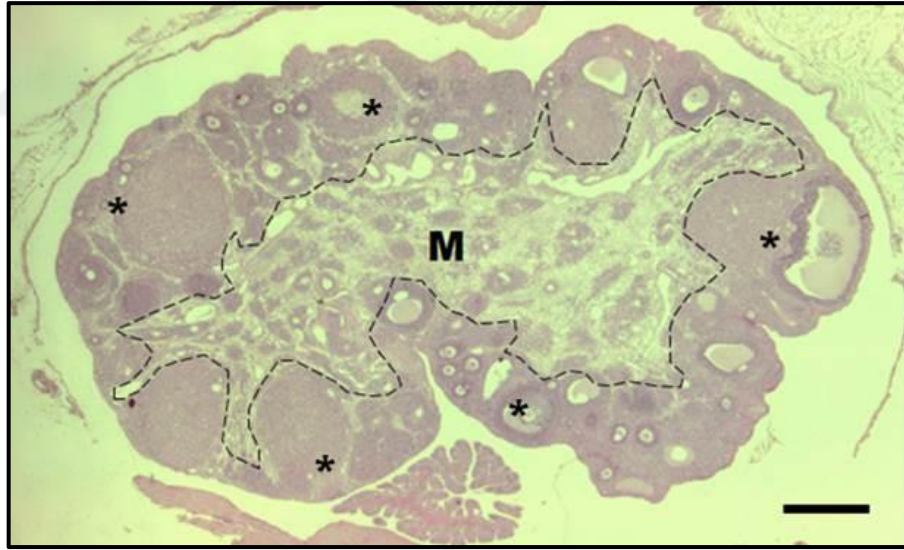
Ovaryumlar kadın üreme sisteminde çift fonksiyon yapan organlardır. Uterusun iki yanında, pelvik kavitenin yan yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunurlar. Ovaryumlar steroid yapıda hormon üretmesi ile endokrin, gamet üretmesi ile ekzokrin fonksiyonu görürler. Ovaryumda östrojen ve progesteron olmak üzere iki önemli hormon salgılanır.

**Östrojen:** İç ve dış üreme organlarının büyümesini destekler. Puberte ile birlikte gelişen dişi seks karakterlerinin gelişmesini düzenler. Bununla birlikte

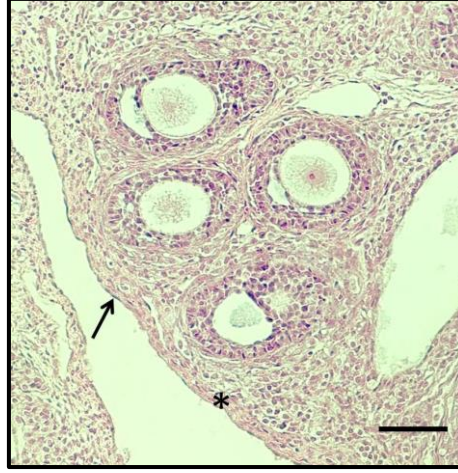
östrojenler meme bezlerinde duktal ve stromal büyüme uyarır ve yağ dokusunu artırarak meme gelişimini sağlarlar.

**Progesteron:** Endometriyumda yaptığı değişikliklerle uterusun gebelik için uygun bir ortam olmasını sağlar. Meme bezlerinde lobular proliferasyonunu sağlayarak bezleri süt vermeye hazırlar.

Ovaryum korteks ve medulladan oluşmaktadır (Şekil 5). Yüzeyi Germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik epitel ile örtülüdür. Germinal epitelyum mesovaryumdan gelen mezotelyumun devamıdır. Germinal epitelin altında ovaryuma beyaz rengini veren sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea katmanı bulunmaktadır (Şekil 6). Tunika albuginea'dan sonra ovaryumda korteks ve medulla olmak üzere iki tabaka bulunmaktadır. Korteks tabakasında ovaryuma ait folliküller yer almaktadır. Folliküller kortikal bölgenin zengin hücresel bağ dokusu (stroma) içine gömülüdürler. Medullada ise gevşek bağ dokusu, büyük kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).



**Şekil 5.** Ovaryuma ait genel bir kesit görüntüsü. **M:** Medulla tabakası, (\*) : Korteks tabakası, kesikli çizgiler medulla- korteks sınırını göstermektedir. **Bar:** 500  $\mu$ m



**Şekil 6.** Ovaryum korteksine ait büyütülmüş bir görüntü. **Ok:** Germinal epitel, **\***: Tunika albuginea.

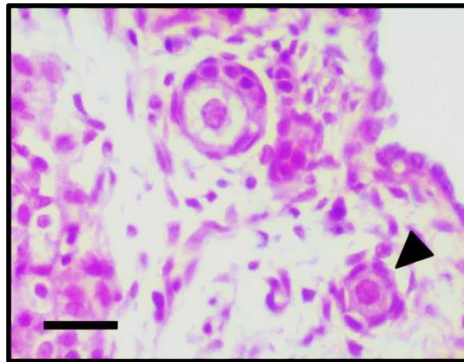
**Bar:** 60  $\mu\text{m}$

### 2.2.2. Follikül Gelişimi

Histolojik olarak üç tip ovaryum follikülü bulunmaktadır.

**1. Primordiyal Folliküller:** Follikül ilk kez fetal dönemin 3. ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal folliküller ortada tek bir primer oosit içeren ve tek sıralı yassı epitelden oluşur. Folliküler hücrelerin dış yüzeyi bazal lamina ile çevrilidir. Bu evrede oosit ve follikül hücreleri birbirine çok yakın bulunmaktadır.

İçerdiği oosit çapı 30  $\mu\text{m}$ 'dır ve dağınık kromatinli büyük bir çekirdeğe sahiptir. Follikül hücreleri organelden zengin olup belirgin golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, bol miktarda mitokondri ve lizozom içermektedir. İleri gelişimi puberteden sonra folliküler epitelin proliferasyonu ve follikülü saran stromanın değişmesi ile sağlanmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011; Şekil 7).



**Şekil 7.** Primordial follikül (ok başı). **Bar:** 50  $\mu\text{m}$

## 2. Büyüyen Folliküller

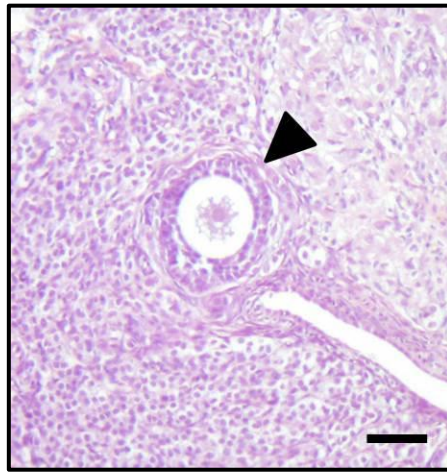
a) **Primer Follikül:** Hipofizden salgılanan FSH follikül hücrelerinin büyümesini sağlamaktadır. Primordiyal folliküllerin etrafındaki yassı hücreler gelişerek kübik şekil almaya başlarlar ve primer folliküle dönüşürler (Ross ve Pawlina, 2011). Primer follikül hücreleri başlangıçta tek katlı kübik hücreler halinde bulunur ve unilaminar primer follikül olarak adlandırılır (Şekil 8). Hızlı mitotik aktiveler sonucu follikül hücreleri çok katlı folliküler epitel yada stratum granulosum tabakasını oluştururlar. Granuloza hücrelerinin arasında yaygın olarak gap junction tipi bağlantılar bulunmaktadır.

Primer oosit büyürken çevresine glikoproteinler ve glikozaminler salgılayan ZP (zona pellusida) olarak adlandırılan ekstrasellüler bir kılıfla çevrilir. ZP, salgılanan ZP-1, ZP-2, ZP-3 olarak adlandırılan 3 farklı glikoprotein içerir. Bunların en önemlisi spermatozoa - bağlayıcı ve akrozom indükleyicisi bulunan ZP-3'tür.

Folliküllerde bu değişiklik olurken stroma hücreleri follikülün etrafını teka follikülü olarak isimlendirilen bağ dokusuyla sarar. Teka follikülü bazal laminanın hemen dışında bulunur. Teka follikülü 2 tabakadan oluşmaktadır;

**Teka interna:** İç tabakada yer alır ve kübik hücrelerden oluşmaktadır. Teka interna hücreler, fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan zengindir. Steroid hormonları üreten teka interna hücrelerinde LH reseptörleri vardır.

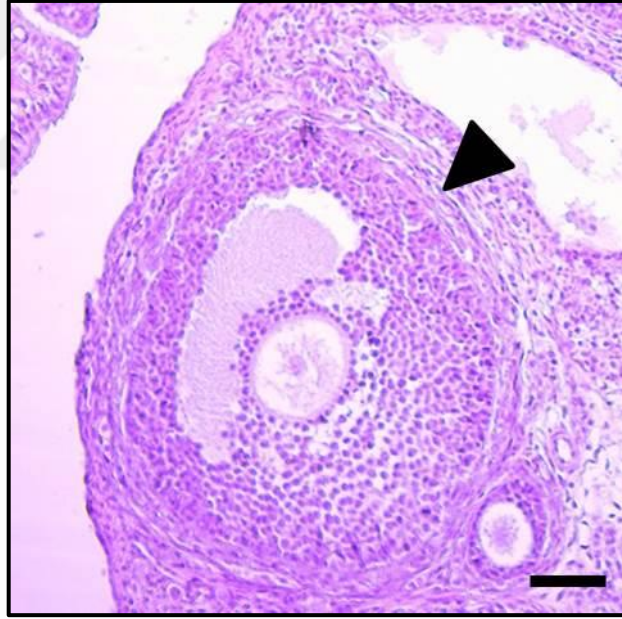
**Teka eksterna:** Dış tabakada bulunur. Düz kas hücrelerinden ve kollajen liflerden oluşmaktadır.



Şekil 8. Primer follikül (ok başı). Bar: 50 µm



**b) Sekonder Follikül:** Multilaminar primer follikül gelişmeye devam ederken stratum granulosum tabakasının kalınlığı artarak çok katlı prizmatik epitele dönüşür. Bu esnada granuloza hücreleri arasına hiyaluronik asitten zengin sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlamaktadır. Bu folliküller sekonder follikül olarak adlandırılmaktadır (Şekil 9). Folliküller büyümeye devam ederken artan sıvı dolu boşluklar birleşerek antrum adı verilen büyük bir boşluğu oluşturmaktadır. Follikül içinde büyüyen sıvı artıp antrum genişledikçe granuloza hücreleri tarafından çevrenmiş olan oosit follikülün kenar kısmına itilmektedir (Ross ve Pawlina, 2011). Antrumu oluşturmak üzere yeniden düzenlenen granuloza hücreleri follikül duvarında belirli yerde yoğunlaşarak küçük bir tepelik oluşturur. Oositi de içeren bu yapı kumulus ooforus olarak adlandırılmaktadır. Bir grup granuloza hücresi oositin çevresinde yoğunlaşır ve korona radiatayı oluşturur (Junquera ve Carneiro, 2006). Korona radiata hücrelerinin yüzeyindeki mikrovilluslarla, oosit yüzeyinde bulunan mikrovilluslar birbirleri ile gap junction tipi bağlantı kurarlar.

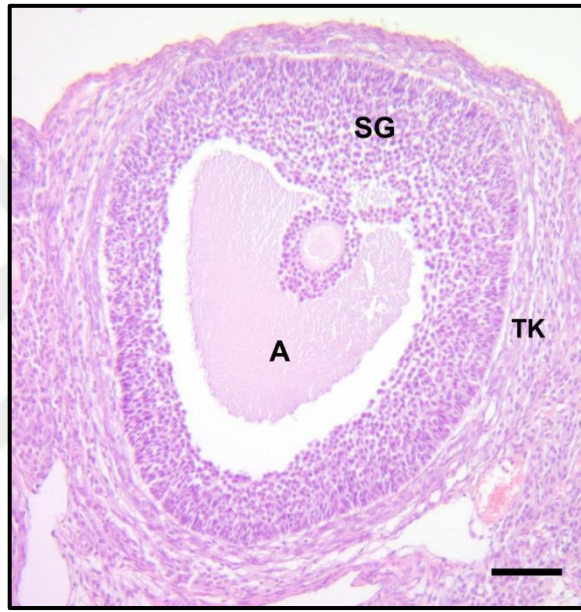


**Şekil 9.** Sekonder follikül (ok başı). **Bar:** 60  $\mu$ m

**c) Tersiyer (Graff) Follikül:** Folliküller hücreler ve antrum boşluğu büyümeye devam ederken follikülün çapı 10 mm geldiğinde tersiyer ya da graff follikül olarak adlandırılmaktadır (Şekil 10). Follikül en büyük boyutuna geldiğinde granuloza hücrelerinin mitotik aktivitelerinde azalma görülmektedir. Stratum granuloza tabakası

incelir ve antrum hacmi en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. Oosit ve oositi çevreleyen hücrelerin granuloza hücreleriyle olan bağlantıları gevşemektir. Böylece oosit ovulasyonla dışarı atılmaya hazır hale gelmektedir.

Tersiyer follikülde teka tabakasında bazı değişiklikler görülmektedir. Teka interna hücreleri lipid biriktirerek steroid sentezleyen hücre özelliği kazanmaktadır. LH ile stimüle edilen hücreler tarafından salgılanan androjenler daha sonra östrojene dönüşmektedirler. Androjenlerin bir kısmı FSH'nun etkisi ile östrojene dönüşmektedirler (Ross ve Pawlina, 2011).



**Şekil 10.** Tersiyer follikül. **SG:** Stratum granuloza tabakası. **TK:** Teka follikülü. **A:** Antrum. **Bar:** 200µm

### 2.2.3. Ovulasyon

Ovulasyon graff follikülden sekonder oositin serbest bırakıldığı süreçtir. Hormonal değişiklikler ve enzimatik etkilerin kombinasyonu ile birlikte birkaç faktör sekonder oositin serbest bırakılmasından sorumludur. Bu faktörler şunlardır;

- Folliküler sıvının hacim ve basıncının artışı.
- Follikül duvarının plazmojenle enzimatik olarak parçalanması.
- Startum granulozum ile oosit-kumulus arasında glikozaminoglikan birikimi
- Prostogladinler tarafından uyarılan teka internada tabakasındaki düz kaslarda oluşan kasılma.

Ovulasyondan hemen önce tersiyer follikülün ovaryum yüzeyine çıkıntı yaptığı makula pellusida veya stigma olarak da adlandırılan bu alanın kanlanması bozulmaktadır. Bu alan daha sonra ruptüre olmaktadır. Korona radiata ve kumulus hücreleri ile çevrili sekonder oosit, ruptüre olmuş follikülden serbest bırakılmaktadır. Ovulasyon zamanında uterin tüplerin fimbriyaları ovaryum yüzeyine çok yakın bir hale gelir ve oositi uterin tüplerin abdominal ostiumunun içine bırakmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011). Ovulasyondan kısa bir süre granuloza ve teka hücreleri morfolojik değişikliklere uğramaktadır. Bu hücreler sitoplazmalarında agranuler endoplazma retikulumu, bol miktarda mitokondri ve lipit damlaları bulunduran steroid sentezleyen hücre özelliğini kazanırlar. Hücrelerinin arasında teka internalardan kaynaklanan çok sayıda kan ve lenf kapilleri bulunmaktadır. Tipik endokrin doku özelliği gösteren bu yapı **korpus luteum** olarak adlandırılmaktadır (Eşrefoğlu, 2011). Korpus luteumda iki tip hücre bulunmaktadır.

**Granuloza lutein hücreleri:** Granuloza hücrelerinde gelişmiş merkezi, büyük hücrelerdir. Sitoplazmalarında ince lipit damlaları bulunan granuloza lutein hücreleri progesteron sentezlemeye başlamaktadırlar.

**Teka lutein hücreleri:** Granuloza lutein hücrelerinden daha küçük hücrelerdir. Teka interna tabakasında perifer yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Ovulasyon öncesi bu hücreler östrojen salgılamaktadırlar.

Korpus luteumda üretilen hormonlar uterusun endometriyum tabakasında salgılama faaliyetini kontrol ederek fertilizasyondan sonrasında gelişen zigotun implantasyonu hazırlamaktadır. Gebelikte bulunan korpus luteum yavaşça gerileyerek gebelikten sonra dejenere olmaktadır. Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum yaklaşık dokuz gün içerisinde dejenere olmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).

#### 2.2.4. Menstrüel Siklus

Puberteden menepoza kadar olan dönemde overler, uterus, serviks, vajina dokularında 28 günde bir tekrarlanan olaya menstrüel siklus denilmektedir. Menstrüel siklus, hipotalamus, hipofiz ve ovaryum da uyarıcı ve baskılayıcı sinyallerin fonksiyonel ve zamansal koordinasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Endokrin sistem olarak işlev gören bu sistemde ilk uyarıcı sinyal hipotalamus tarafından salgılanan GnRH ile, hipotalamustan hipofize portal venöz sistem yoluyla iletilmektedir. GnRH,

ön hipofizde FSH ve LH sekresyonunu uyarmaktadır. FSH ve LH, follikül gelişimini, ovulasyonu, korpus luteum oluşumunu; tüm bunların yanı sıra bazı hormonların üretimi ve sentezini (östrojen, progesteron, glikoprotein olan inhibin A ve B) koordine etmektedir (Ünlü ve Berker, 2008; Düzova ve Emre, 2011).

Menstrüel siklus başlangıcının ilk bulgusu 3-5 gün devam eden menstrüel kanamadır. Menstrüel kanamanın ilk gününden ovulasyona kadar devam eden östrojen hormonunun salgısı ile ovaryen folliküler gelişmektedir. Döngünün 14. gününde ovulasyon olmaktadır. Döngünün süresi folliküler dönemin uzunluğuna göre değişmektedir.

Menstrüel siklus, folliküler dönem ve luteal dönem olmak üzere iki farklı dönemleri içermektedir.

**1. Folliküler Dönem:** Menstrüel kanamanın başlaması ile birlikte 10-20 kadar az sayıda primer follikülün gelişmesiyle başlamakta ve bir dominant follikülün büyüüp gelişerek ovulasyona hazır hale gelene kadar devam etmektedir. Menstrüel kanama başlar başlamaz gelişen follikülden, follikül boyutundaki büyüme ve granuloza hücre sayısındaki artmaya paralel olarak salgılanan östrojen ve inhibinin seviyeside artmaya başlamaktadır. Bu artış ile negatif feedback sonucu FSH seviyesi düşmeye başlar. FSH granuloza hücrelerinden aromataz enzimini aktive ederek androjenlerin östrojene dönüşümünü sağlamaktadır. FSH'ın düşmesi büyümekte olan dominant follikül çevresinde daha androjenik bir mikroçevrenin oluşmasına sebep olmaktadır. Ayrıca büyümekte olan folliküllerin granuloza hücrelerinden salgılanan çeşitli peptitler komşu folliküllerin gelişimini engellemektedir (Ünlü ve Berker, 2008; Ross ve Pawlina, 2011). Folliküler fazda artan östrojen seviyesi, FSH seviyesini düşürmesinin yanı sıra LH seviyesini yükselmekte ve bu artıştan 36 saat sonra ovulasyon meydana gelmektedir (Ross ve Pawlina, 2011).

**2. Luteal Dönem:** Ovulasyondan hemen sonra granuloza ve teka hücreleri hızlı bir şekilde morfolojik değişikliklere giderek korpus luteumu oluşturmaktadır. Östrojen ve büyük miktarda progesteron korpus luteumdan salgılanmaktadır. Bu iki hormonun, özellikle progesteron hormonu altında uterusun endometriyum tabakası salgılama fazına başlamaktadır. Bu faz endometriyumu fertilize olmuş ovumun implantasyonu için hazır hale getirmektedir (Ross ve Pawlina, 2011). Korpus luteumun fonksiyonu ovulasyondan 9-11 gün sonra azalmaya başlamaktadır (Ünlü ve Berker,

2008). Buna paralel olarak östrojen ve progesteron seviyesinin azalması ile birlikte luteal dönem sonlanmaktadır (Düzova ve Emre, 2011).

### 2.2.5. Uterus Histolojisi

Mesane ile rektum arasında pelvis boşluğunda bulunan uterus, dişi üreme sisteminin önemli bir organıdır. Uterus döllenmiş oositin yerleşiminden doğuma kadar birçok morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler geçirmektedir

Histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır.

**1. Endometriyum:** Uterusun en iç kısmında bulunan mukoza tabakasıdır. Yüzey epiteli tek katlı silyalı prizmatik epitelidir. Oldukça kalın olan lamina propria tabakasında uterus bezleri bulunmaktadır. Uterus bezleri, bazal bölümleri dallanabilen basit tübüler bezlerdir. Endometriyum tabakası iki kısımda incelenmektedir.

**a) Stratum fonksiyonalis:** Endometriyum'un 2/3'lük kısmını oluşturmaktadır. Menstrual siklus sırasında dökülmekte ve her 28 günlük dönemde kendini yenilemektedir.

**b) Stratum bazale:** Endometriyum'un 1/3'lük taban kısmını oluşturan bu tabaka menstrual siklusta dökülen stratum fonksiyonalis tabakasının yenilenmesini sağlamaktadır.

Endometriyum, menstrual siklus döneminde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere göre dört dönemde incelenmektedir. Menstruasyon bitiminden sonra başlayan proliferatif dönemde endometriyum tabakasının hızla rejenerasyonla karakterize olan dönemdir. Bezler genişleyerek kıvrım yapmaktadırlar. Stromal hücrelerin bağ dokusu lifleri ve esas maddeyi sentezlemeleri sonucunda lamina propria yeniden oluşmaktadır. Endometriyum kendini yeniledikçe spiral arterler uzama gösterip kıvrılmaktadırlar. Bu dönem östrojenlerin etkisi altında ovulasyondan sonraki 1. güne kadar devam etmektedir.

Ovulasyondan 1-2 gün sonra başlayan sekretuar dönem progesteronun kontrolü altındadır. Bu dönemde iyice kıvrılan endometriyum bezlerinin lümeni genişlemektedir. Spiral arterler kıvrılmaya devam ederek endometriyumun yüzeyine kadar gelmektedirler. Stromal hücreleri bez hücreleri gibi genişleyerek glikojenden zengin desidua hücrelerine dönüşmektedirler.

Progesteron seviyesinin düşmeye başladığı, mensturasyondan önceki dönem iskemik dönemdir. Bu dönemde spiral arterlerde ani büzüşmeye bağlı olarak fonksiyonel tabakada iskemi oluşmaktadır. Bunun sonucunda endometriyum büzülmeye başlamaktadır. Son dönem olan menstrasyon döneminde spiral arterlerin kontraksiyonu sonucunda yüzey epitelinde dökülme ve arter duvarında yırtılma başlamaktadır. Fonksiyonel tabaka nekroza uğrayıp dökülmektedir.

**2. Miyometriyum:** Bağ dokusu ile kas lifi demetlerinden oluşan, tuba uterina ve vajinanın kas tabakası ile devamlılık gösteren kalın tabakadır. Gebelik döneminde miyometriyumun kalınlığı mevcut kas hücrelerinin hipertrofisi ve hiperplazi oluşumu ile önemli derecede artmaktadır.

**3. Perimetriyum:** Mezotelyum ve altında uzanan bağ dokusundan oluşan tabakadır. Elastik lif bakımından zengin olan bu tabaka uterusun arka yüzü ve ön yüz bölümünü döşemektedir. Ön yüzün alt yarısı ise bağ dokusundan oluşan adventisya özelliğindedir (Junqueira ve Carneiro, 2006; Ross ve Pawlina, 2011).

### **2.3. Dişi Sıçanların Genital Özellikleri**

Yetişkin sıçanlarda ovaryum folliküllerle dolu bir yapıdadır ve böbreklerin kranial kutbunda yer almaktadır. Helozoik yapıdaki tuba uterina, ovaryumu bikornual yapıdaki uterusu bağlamaktadır. Ovaryum epitelini tek sıralı kübik yada prizmatik epitel ile örtülüdür (Mülazımoğlu ve ark., 2012).

Sıçanların uterusu sağ ve sol kornusu olduğu için bikornual uterus olarak adlandırılmaktadır. Her iki kornus kan damarları bakımından zengindir. Sıçan uterusunun bu özelliklerinden dolayı bir doğumda çok sayıda yavru doğurabilmektedir. Uterus tek katlı prizmatik epitel ile örtülüdür. Endometriumda bulunan uterus bezleri tunika submukoza içindeki lamina propriyaya yerleşmişleridir. Miyometrium uterusun tunika muskularisini oluşturmaktadır. İçte sirküler dışta longitudinal kaslardan oluşan tabakada büyük kan damarları bulunmaktadır. Perimetrium uterusun tunika seroza kısmıdır, gevşek bağ dokusu özelliği gösterir ve çok sayıda lenfatik damarlar içermektedir (Yılmaz, 2008).

Yapılan bir çalışmada gonadotropin ve morfolojik özelliklerine göre prepubertal ovaryum gelişimi 4 döneme ayrılmıştır.

1. Neonetal dönem (doğum-1. hafta)
2. İnfantil dönem (1-3 hafta arası)
3. Jüvenjil dönem (3-4,5 hafta arası)
4. Peripubertal dönem (jüvenjil dönem sonrası 3 gün)

Neonatal dönemde ovaryumlar FSH etkisi ile testosteronu östrodiol-17 $\beta$ 'ya metabolize edilmektedir. İnfantil dönemde follüküller östrojen sekresyonuna başlamaktadır. Peripubertal dönem boyunca uterus sıvı ile doludur, follüküller büyük miktarda östrojen salgılamakta ve gonadotropinlerdeki artış ilk ovulasyonu sağlamaktadır.

Ovaryum gelişimi gonadotropinlere, FSH, LH, GnRH, prolaktin ve büyüme hormonuna bağlıdır. FSH seviyeleri doğumdan 12. güne kadar kademeli olarak düşmektedir. GnRH salınımları esnasında LH konsantrasyonu yavaşça artarak yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Jüvenjil dönemde her 3 saatte bir prolaktin salınımı meydana gelmekte ve bu salınım ovaryumdan östradiol ve progesteron salınımını indüklemektedir (Mülazımoğlu ve ark., 2012).

### **2.3.1. Sıçanlarda Gebelik ve Doğum**

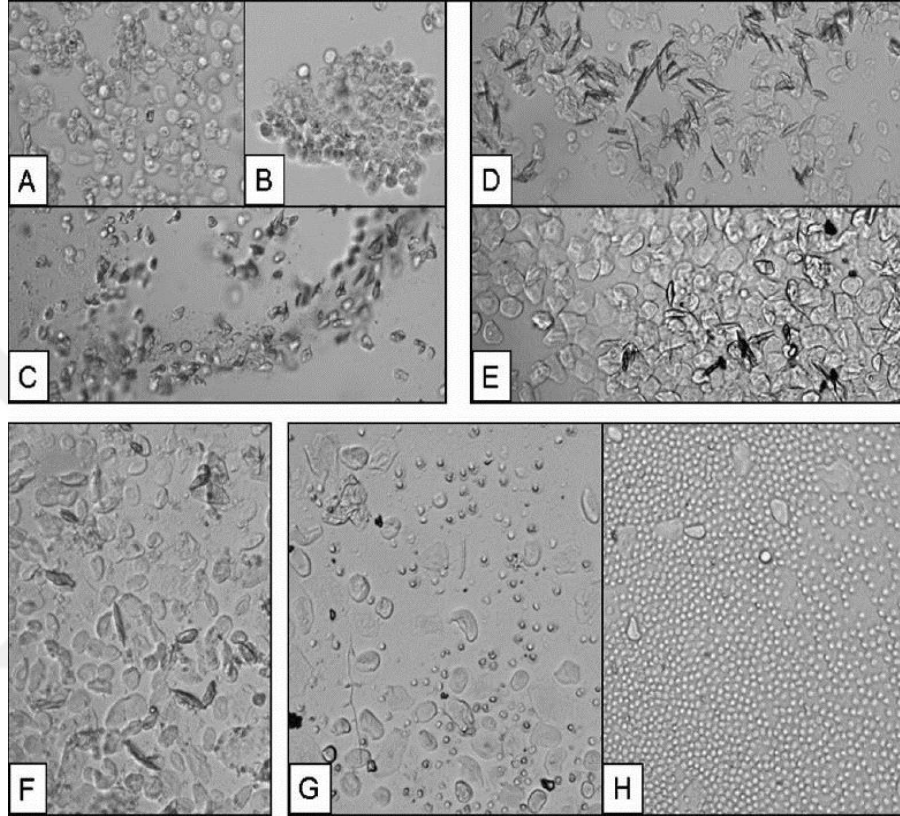
Sıçanlarda gebelik yaklaşık 21 gün sürmektedir. Vajinal sürüntüde spermin görülmesi gebelik için kesin bilgi olarak kabul edilmektedir. Abdominal genişleme 13. günden itibaren meydana gelmektedir. 14. günde meme bezleri gelişmeye başlamaktadır. Progesteron değerleri gebeliğin 7. ve 13. günlerinde en yüksek düzeye ulaşmaktadır (Mülazımoğlu ve ark., 2012).

Diğer hayvan türlerinden farklı olarak sıçan embriyosu östrojen üretmez ve maternal östrojen implantasyonu düzenlemektedir. Ovaryum gebelik boyunca gebelik korpus luteumunun aktif olabilmesi için östrojen salgılamaya devam etmektedir. Östrojen sıçan plasentası tarafından üretilmez ve plasental progesteron da gebeliğin devamı için yeterli olmaktadır. Serum LH değerlerinde gebeliğin 11. gününde diğer günlere göre önemli artış görülmektedir (Mülazımoğlu ve ark., 2012).

### **2.3.2. Sıçanlarda Östrus Siklus**

Sıçanlarda östrus siklus 14 günde bir ortalama 4-5 gün sürmektedir. Yaşlanma ile beraber bu süre uzayarak 5-6 günü bulmaktadır (Sözen, 2008). Siklus 'vajinal smear' yöntemi ile tespit edilmektedir. Vajinal smear yöntemi sıçanların vajinal duvarından

sürüntü alınmasıya elde edilen preparatların herbir siklusa özgü hücre tipilerinin histolojik olarak taranması esasına dayanmaktadır (Şekil 11). Östrus siklus proöstrus, östrus, diöstrus ve metaöstrus olmak üzere 4 dönemden meydana gelmektedir (Assessment ve ark., 2008).



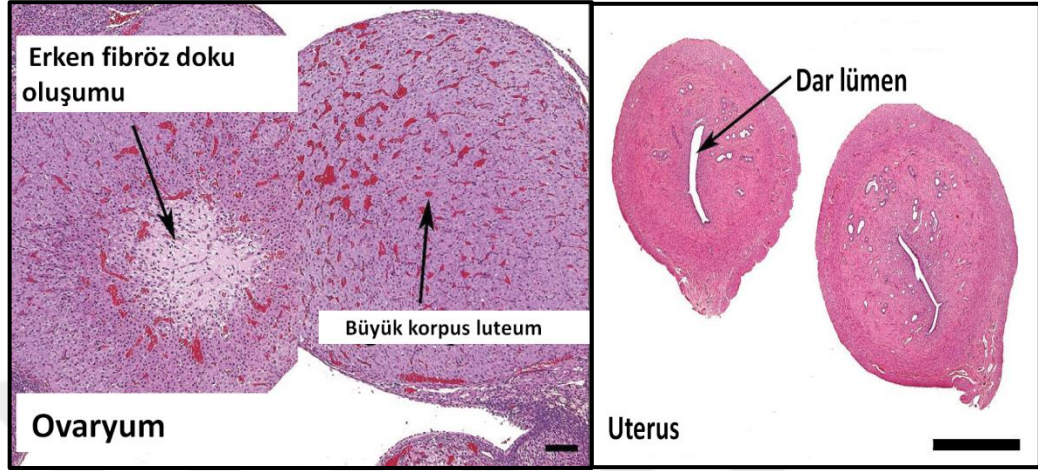
**Şekil 11.** Sıçanların vajinal duvarından alınan sürüntü ile elde edilen vajinal smear örneklerin boyanmamış mikroskopik görüntüsü. **A, B, C:** Proöstrus evresi; Granul görünümüne sahip çekirdeksiz hücreler kümleri görülmektedir. **D, E:** Östrus evresi; Ağırlıklı olarak çekirdekli süperfisyel hücrelere rastlanırken, keratinize süperfisyel hücrelerde görülmektedir. **F:** Metaöstrus evresi; çekirdekli ve kornifiye hücreler arasında bol miktarda lökosit bulunmaktadır. **G, H:** Diöstrus evresi; Vajinal smear örneklerinde çok az sağlam hücreye rastlanır. Dominant hücre tipi lökositlerdir (Goldman ve ark., 2007'dan uyarlanmıştır)

**Diöstrus:** Diöstrus, östrus siklusunun en uzun dönemidir. Yaklaşık 57 saat sürmektedir. Vajinal smear örneklerinde çok az sağlam hücreye rastlanır. Dominant hücre tipi lökositlerdir (Mülazımoğlu ve ark., 2012).

Bu dönemde uterus, dar bir lümeneye, kısa kübik ya da silindirik epitele sahiptir. Uterus bezleri inaktifdir. Bu fazın sonuna doğru stromada ödem oluşabilmektedir.

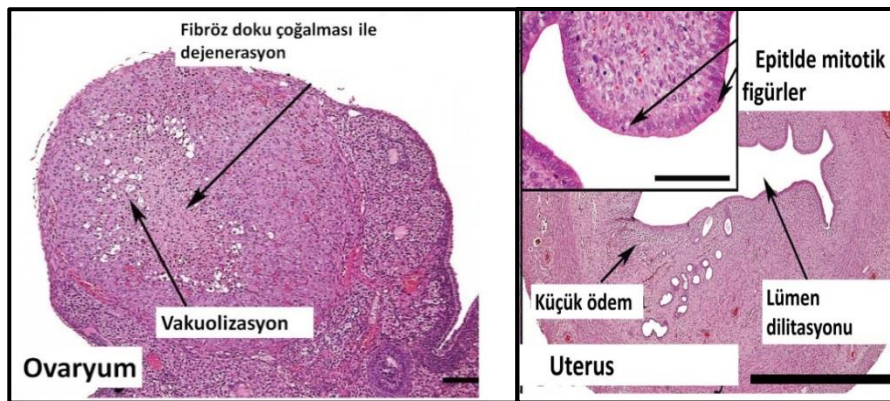


Ovaryumda bir önceki ovulasyondan kalma korpus luteum çok büyük bir hacimde görülmektedir (Westwood, 2008; Şekil 12). LH ve FSH düzeyleri düşüktür. Bu evrede östradiol düzeylerinde azalma görülmektedir (Sözen, 2008).



Şekil 12. Sıçanlarda diöstrus evresinde ovaryum ve uterusun görünümü. Ovaryum için bar: 100 µm, uterus için bar: 1000 µm (Westwood, 2008'dan uyarlanmıştır)

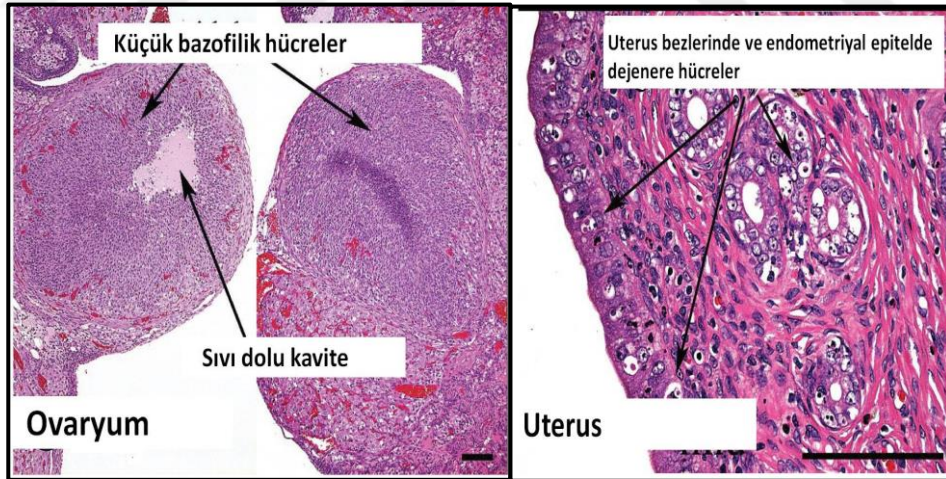
**Proöstrus:** Sıçanlarda bu dönem 12 saat sürmektedir (Mülazımoğlu ve ark., 2012). Vajinal smear örneklerinde bol miktarda çekirdeksiz yuvarlak hücreler bulunmaktadır. Uterus bu dönemde uzun kübik prizmatik epitele sahiptir ve mitotik figürlere rastlanmaktadır. Uterus lümeni diöstrus evresine göre daha genişlemiştir. Ovaryumda korpus luteum hücreleri dejenere olmaya başlamıştır ve vakuolizasyon görülmektedir. (Westwood, 2008; Şekil 13).



Şekil 13. Sıçanlarda proöstrus evresinde ovaryum ve uterus görünümü. Ovaryum için bar: 100 µm, uterus için bar: 1000 µm (Westwood, 2008'dan uyarlanmıştır)

Proöstrus evresinde LH atılımı en yüksek seviyededir. Proöstrus evresinde salınan LH dalgaları preovulatar folliküllerde ovulasyonun meydana gelmesine ve korpus luteanın şekillenmesine neden olmaktadır. Östradiol bu evrenin başlangıcında en düşük düzeydedir evrenin sonlarına doğru en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Östrus evresine geçerken östradiol düzeylerinde azalma görülmektedir. Ayrıca bu evrede FSH, östrojen ve progesteron en yüksek seviyelerdedir. FSH'da yavaş bir artış gözlenmektedir (Sözen, 2008; Mülazımoğlu ve ark., 2012).

**Östrus:** Siklusun bu evresi 12 saat sürmektedir. Vajinal smear örneklerinde dönemin başına doğru %75 çekirdekli süperfisyal ve %25 keratinize süperfisyal hücreler rastlanırken dönemin sonuna doğru bu oran keratinize süperfisyal hücreler lehine değişmektedir (Mülazımoğlu ve ark., 2012). Bu evrede endometriyal epitelde ve uterus bezlerinde dejenerasyon görülmektedir. Ovaryumda sıklıkla dejenere olmuş korpus luteum, küçük bazofilik hücreler ve yer yer sıvı dolu kavite görülmektedir (Westwood, 2008; Şekil 14). LH düşük düzeyde, FSH ise en yüksek düzeydedir. Östradiol düzeyi düşmeyi sürdürür ve bu evrenin ortalarında en alt düzeyde olmaktadır. Östrus sonuna doğru ovulasyon oluşmaktadır (Sözen, 2008).



**Şekil 14.** Sıçanlarda östrus evresinde ovaryum ve uterusun görünümü. Ovaryum için bar: 100 µm, uterus için bar: 1000 µm (Westwood, 2008'dan uyarlanmıştır)

**Metaöstrus:** Metaöstrus evresi ovulasyondan sonra görülür ve yaklaşık olarak 21 saat kadar sürmektedir. Dönemde alınan vajinal smear örneklerinde çekirdekli ve kornifiye hücreler arasında bol miktarda lökosit bulunmaktadır. Metaöstrus boyunca,

korpus luteadan progesteron salınmaktadır. Endometriyal epitelde vasküler dejenarasyon görülmektedir (Westwood, 2008). LH seviyesi östrus evresine göre düşüş göstermektedir (Sözen, 2008).

## **2.4. Stereoloji**

Stereoloji; üç boyutlu olan yapıların, onların iki boyutta olan görüntülerinde yapılan geometrik özelliklerine (sayı, hacim, uzunluk gibi) ait sayısal verileri hakkında bilgi edinilmesini sağlayan bilim dalıdır. Stereoloji; araştırmacılara, elde etmek istedikleri verileri hesaplama yolu ile bulmayı sağlayan bir seri etkin araç sunmaktadır. Sunulan bu araçlar, tarafsız (yani varılmak istenilen gerçek değerlerden sistematik olarak uzaklaşmayan) sayım ve ölçüm prensiplerine dayanır (Korkmaz ve ark., 2002).

Tarafsız stereolojik sayım metotları adı verilen metodolojideki prensipler, güvenilir özellikte olan metotların temelini oluşturacak bir potansiyele sahiptir. Bu prensiplerin uygulanması; biyolojik bir dokunun, sınırları tanımlanabilen bir bölgesinde yer alan objelerin toplam sayılarının hesaplanmasında kullanılacak sayım ve örnekleme tekniklerinin gelişimi ile sonuçlanmıştır. Bu tekniklerin en önemli özelliği; çalışılan bölgenin tüm kısımlarına eşit derecede örneklenebilme ihtimalini veriyor olmasıdır. Bir diğer özellik de, ilgili objelerin büyüklük, şekil ve yönelimleri hakkında herhangi bir varsayıma gerek kalmadan belirli bir hacim içerisinde doğrudan sayılabilmeleridir. Bu teknikler prensiplerine uygun olarak uygulandıklarında, toplam obje sayısına ait hesaplamaların ortalamaları giderek gerçek değere yaklaşacaktır. Yani, bu teknikler ile toplam obje sayısına ait yapılan hesaplamalar tarafsızdırlar (Geinisman ve ark., 1996; West, 1999).

### **2.4.1. Sistemik Rastgele Örnekleme**

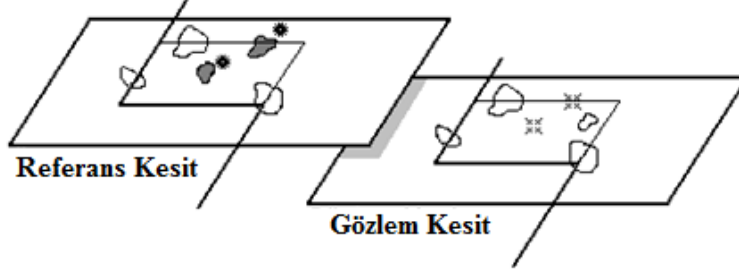
Stereolojik çalışmalarda verilerin gerçek değerlerinden sistematik olarak bir sapma göstermemesi ve güvenilir olması için dikkat edilmesi gereken durumlardan biriside örnekleminin doğru yapılmasıdır. SRÖ'de (sistemik rastgele örnekleme) sistemik sözcüğü; önceden belirlenen sabit aralıkla yapının örneklenebilmesini ifade ederken, rastgele sözcüğü ise sistemik olarak tekrarlanan örnekleminin her aşamasında ilk elemanın tarafsız yani tesadüfen seçilmesidir (Howard ve Reed, 1998). SRÖ, pilot bir çalışma ile belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilk aralık içinden rastgele bir noktadan başlanarak, ilgilenilen yapının tamamının etkin bir şekilde

örneklemesini içermektedir. İstatistiksel açıdan bu tip örneklemede, yapının üzerinde örnekleme sayısı ne kadar artarsa gerçek değere o kadar yaklaştığı için homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansıda o kadar artmaktadır (Gundersen ve Jensen, 1987).

#### **2.4.2 Üç Boyutlu Ortamda Sayım: Disektör**

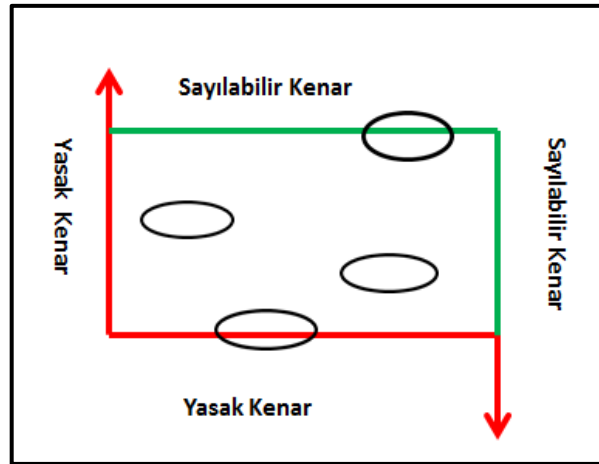
Disektör ilk kez 1984 yılında Sterio isimli İskandinav bir stereolog tarafından tarif edilmiştir. Disektör, tanecikle ilgilenen doku bileşeni olarak ifade edilir. Bu sözcüğün anlamı ve içeriği yapılan çalışmaya göre değişir. Çalışmanın özelliğine göre ilgilenilen yapı hücre, çekirdek, organel, sinaps veya çekirdekçik olabilir. Örneğin ovaryumdaki granuloza hücreleri ile ilgili bir çalışmada granuloza hücresi tanecik olarak adlandırılır. Disektör prensibi şu gözleme dayanır: Bir kesit serisinde bir hücrenin bir kesitte görülüp bir öncekinde görünmeme ihtimali hücrenin büyüklüğüne, şekline veya yönelimine bağlı değildir. Çünkü bütün hücrelerin (büyüklük, şekil ve yönelimlerinden bağımsız olarak) sadece bir tane uç noktaları vardır. Disektörün temel mantığında da taneciklerin kesit alma doğrultusu boyunca ilk ortaya çıktıkları veya son görüldükleri kısımları yani ‘uç noktalarını’ bulmaktır. Bu mantıkla iş gören bir metot gerçek tanecik sayısına ulaşılmasını sağlamaktadır (Sterio, 1984).

Disektör yönteminin fiziksel ve optik disektör olmak üzere iki uygulama şekli bulunmaktadır. Fiziksel disektör, disektörün ilk ortaya çıkış biçimidir (Sterio, 1984). Yöntem birbirine belirli uzaklıkta bulunan yer alan ardışık iki histolojik kesit çiftlerinden meydana gelmektedir. Bu iki kesitten birisi ‘referans’ diğeri ise ‘gözlem’ kesiti olarak adlandırılır. Bu kesit çiftlerinde uygulanacak kural sayım kuralı ise; kesit çiftlerinden birinde gözlenip diğeri gözlenmeyen partiküllerin izdüşümlerini saymaktır (Şekil 15). Yukarıda belirtildiği gibi, bu tarz bir yaklaşımda partiküllerin büyüklük, şekil ve yönelimleri gibi özelliklerinin önceden bilinmesine veya onlar hakkında herhangi bir varsayımda bulunmaya gerek yoktur. Gerekli olan şey, kullanılan kesit serisinde gözlenen profillerin her birinin hangi partiküle ait olduğunun bilinmesidir. Bu sayım yaklaşımı ile, tümüyle kesitler şekline dönüştürülmüş olan bir yapıdaki hücrelerin gerçek sayısı elde edilmiş olunur (Sterio, 1984).



**Şekil 15.** Fiziksel disektör uygulamasının şematik şekli. Kesitlerden biri örnek, diğeri gözlem kesiti olup, örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan partiküllerin izdüşümleri sayılmaktadır (<http://www.3.bp.blogspot.com>, 2015)

Fiziksel disektör de karşımıza bir problem çıkmaktadır. Bir kesit alanında gözlenip diğesinde gözlenmeyen hücrelerin sayısına karar verileceği için, iki boyutlu bir ortamda (yani, kesit görüntüsü ortamında) yer alan hücre profillerinin sınırları belirli bir alan ile tarafsız olarak ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Bu sorun, disektörün ortaya çıkışından önce 1977 yılında geliştirilen ‘tarafsız sayım çerçevesi’ ve ilgili sayım kuralı ile çözümlenmiştir (Gundersen, 1977; Şekil 16). Bu sayım çerçevesi ile iki boyutlu ortamda hücre profilleri tarafsız olarak örneklenebilmektedir. Tarafsız sayım çerçevesi ile iki boyutlu ortamda gerçekleştirilen örnekleme işlemi, disektör olarak adlandırılan araç ile üç boyutlu ortama taşınır. Yani, birinin iki boyutlu ortamda yaptığını diğeri üç boyutlu ortamda yapmaktadır (Gundersen, 1977;1978; Gundersen ve ark., 1988a ve b)



**Şekil 16.** Tarafsız sayım çerçevesi. Yasak kenarlara denk gelen partiküller dışında tüm partiküller sayıma dahil edilmektedir.

Burada dikkat edilmesi gereken kısım, yapının tümünün disektörlerle ele alınıp hücrelerin tümünün sayılması durumunda, hücrelerin gerçek sayısı elde edileceği halde; örnekleme yapılması durumunda toplam sayı yerine hücrelerin yoğunluklarının elde edileceğidir. Çünkü bir kesitteki belirli alanda bulunup ondan belirli bir mesafe uzaklıkta yer alan eşdeğer bir alanda bulunmayan hücreler tespit edilmiştir. Yani belirli hacimde yer alan hücreler tarafsız olarak örneklenmiştir.

Tarafsız sayım çerçevesi, komşu iki kenarı serbest diğer iki kenarı yasak olan basit dikdörtgen veya kare olan bir sistemdir. Serbest kenara temas eden tanecikler sayılırken, yasak kenara temas eden tanecikler sayım dışı bırakılmaktadır. Tarafsız sayım çerçevesi, tanecik sayımı için, en etkili ve güvenilir sayım çerçevesidir. Bu çerçevenin tanecikleri izdüşümlerini en doğru biçimde saymayı sağladığı, geometrik hesaplamalarla da kanıtlanmıştır (Gundersen, 1977).

### 3. MATERYAL-METOD

#### 3.1. Deney Hayvanları

Hayvanlara uygulanan tüm işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu kararına ve yönergesine uygun kurallar doğrultusunda gerçekleştirildi. Deneyler için 9 adet gebe Wistar albino sıçandan elde edilen, 60 günlük dişi 15 adet yavru sıçan kullanıldı. Hayvanlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Gebe sıçanlardan her grupta 3 adet olacak şekilde 3 grup oluşturuldu.

**Kontrol grubu:** Gebeliğin 6.-15. günlerinde serum fizyolojik verilen grup.

**Metformin 100 grubu:** Gebeliğin 6.-15. günlerinde 100 mg/kg/gün metformin uygulanan grup.

**Metformin 200 grubu:** Gebeliğin 6.-15. günlerinde 200 mg/kg/gün metformin uygulanan grup.

Esas çalışmaya geçmeden önce sıçanların gebe bırakılması ile ilgili pilot bir çalışma gerçekleştirildi. Bunun için birer adet dişi ve erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar çiftleştirilmek üzere bir gece aynı kafeste tutuldu. Çiftleşmeden sonraki gün vajinal plak görülen dişi sıçanlar gebe olarak değerlendirildi (gebeliğin 0. günü). Gebe kalan sıçanlara gruplara uygun olarak ilaç verildikten sonra her bir sıçanın normal vaktinde doğum yaptığı gözlemlendi. Esas çalışmada ise her gruptan iki adet olmak üzere toplamda 6 adet dişi sıçan ayrı ayrı kafeslere alındı.

Gebe sıçanlar standart plastik kafeslerde, sıcaklığı  $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  olan odalarda tutuldu. Dozaj dönemleri olan gebeliklerinin 6.-15. günleri arasında günlük olarak tartıldı ve ağırlıklarına göre ilaç dozaj ayarlaması yapıldı. İlaç her gün aynı saatte gavaj yoluyla verildi. Kontrol grubuna ise sadece serum fizyolojik aynı tarzda verildi. Gebe sıçanlardan elde edilen yavrular yine  $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  olan odalarda P (postnatal) 30. güne kadar anneleri ile birlikte aynı kafeste tutuldu. Otuzuncu günün sonunda her bir gruptaki yavrular erkek ve dişi olarak ayrılıp farklı kafeslere alındı. P60. günden sonra her bir yavru dişi sıçandan, östrus siklusunun aynı evresinde olduğunu tespit etmek için vajinal sürüntü alındı. Sürüntü örnekleri incelendikten sonra uygun dönemde olanlar perfüzyon işlemine tabi tutuldu.

### **3.2. İlacın Temini ve Hazırlanması**

Çalışmada kullanılan etken madde Biofarma İlaç San. ve Tic. A.Ş.'den (Türkiye) toz halinde temin edildi. Metformin 100 grubu için 100 mg/kg/gün, Metformin 200 grubu için 200 mg/kg/gün olacak şekilde 1 ml serum fizyolojikte sulandırılan etken madde gavaj yoluyla verildi.

### **3.3. Histolojik İşlemler**

#### **3.3.1. Perfüzyon ve Tespit İşlemleri**

Perfüzyon işlemi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Sıçanlar perfüzyon işleminden önce intraperitoneal olarak Ketalazin (50 mg/kg) ve Ksilazinden (10 mg/kg) oluşan karışımla derin anestezi altına alındı. Sıçanların anestezi düzeyleri ekstremite refleksi ile kontrol edildi ve ağırlıkları kaydedildi. Keskin bir bıçakla açılan göğüs kafesinden akciğere zarar vermeden kalp ortaya çıkarıldı. Kanül ile kalbin sol ventrikülüne girilerek 37°C sıcaklığında serum fizyolojik verildi ve sağ atriuma bir kese atılarak kanın buradan dışarı çıkması sağlandı. Sağ atriumdan gelen kan berraklaşınca kadar serum fizyolojik verilmeye devam edildi. Daha sonra %10'luk nötral formalin solüsyonu verilerek perfüzyon - fiksasyon işlemi tamamlandı. Perfüzyon - fiksasyon sonrası zarar vermeden çıkarılan ovaryumlar ve uterus (Şekil 17a,b) %10'luk nötral formalin solüsyonu içerisine alınarak 48 saat bekletildi.

#### **3.3.2. Doku Takibi**

Ovaryumlar ve uterus fiksasyon işleminin ardından doku takibine alındı. Tespit solüsyonundan çıkarılan dokular bir gece akarsuda yıkandıktan sonra Tablo 2'de belirtildiği şekilde doku takibine alındı.

Doku takibinin ardından dokular parafine gömülerek, parafin blokları hazırlandı (Şekil 17c).

#### **3.3.3. Kesit Alma**

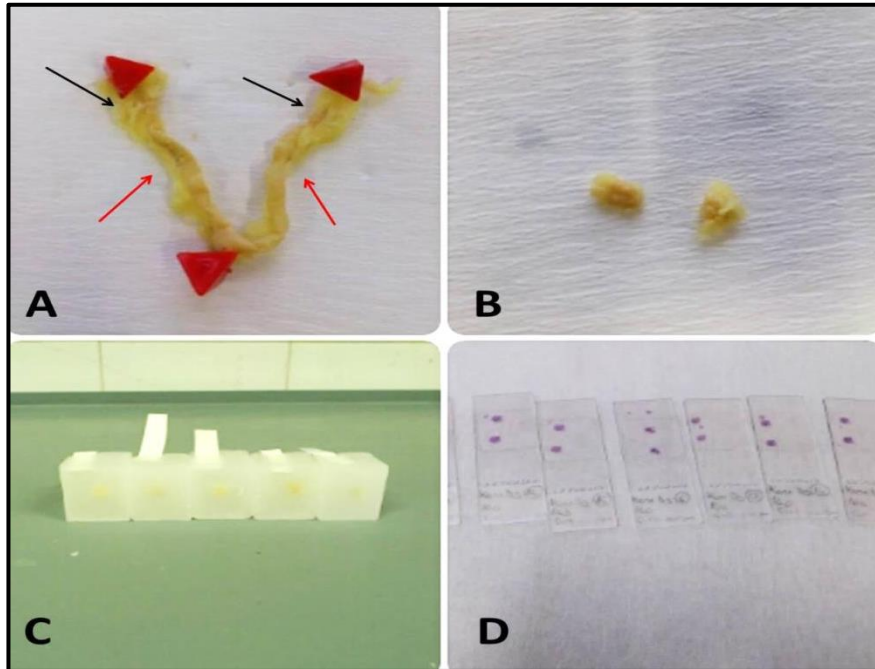
Parafin bloklara gömülen dokular rotary mikrotomu (Leica RM2125RT; Şekil 18) ile sistematik rastegele örnekleme kurallarına uygun şekilde kesildi. Böylece ovaryum dokusu için 1/20, uterus için 1/40 örnekleme aralığı ile 5 µm kalınlığında,



kesit çifti elde edildi. Daha sonra ~60°C'lik etüvde 2 saat bekletilerek dokuların lamlara yapışması sağlandı (Şekil 17 d).

**Tablo 2.** Doku takip işlemine ait basamaklar

DOKU TAKİP MATERYALİ	SÜRE
%70 Alkol	2 saat
%80 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
Absolu Alkol	1 saat
Absolu Alkol	1 saat
Ksilen	15 dakika
Ksilen	15 dakika
Parafin (sıvı)	1 saat
Parafin (oda ısı)	Bir gece
Parafin (sıvı)	1 saat
Parafin (sıvı)	1 saat



**Şekil 17.** A: Sıçanlara ait ovaryum (siyah oklar) ve uterus (kırmızı oklar). B: Diseke edilen ovaryumlar. C: Ovaryum dokularının bloklanması. D: Kesit alım işleminin ardından dokuların preparat haline dönüştürülmesi



**Şekil 18.** Kesit alma işleminde kullanılan rotary mikrotomu (Leica RM2125RT)

### 3.3.4. Boyama İşlemleri

Çalışmada ovaryum ve uterus dokuları Hemotoksilen-Eozin boyası ile boyandı. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 15'er dakika 3 farklı ksilende, rehidratasyon işlemi için sırayla; %100, %96, %80, %70'lik alkol serilerinde 5'er dakika bekletildikten sonra akarsu altında 5 dakika yıkandı. Daha sonra Tablo 3'de verilen şekilde boyama işlemi gerçekleştirildi.

**Tablo 3.** Boyama işlemine ait basamaklar

BOYAMA MATERYALLERİ	SÜRE
<b>Hematoksilen</b>	3 dakika
<b>Akarsu</b>	5 dakika
<b>Eosin</b>	1 dakika
<b>%80 Alkol</b>	20 saniye
<b>%96 Alkol</b>	20 saniye
<b>%96 Alkol</b>	20 saniye
<b>Absolu Alkol</b>	5 dakika
<b>Absolu Alkol</b>	5 dakika
<b>Ksilen</b>	1 saat

Boyama işleminden sonra lamaların üzerine Entellan® damlatılarak lamel ile kapatılıp penset yardımıyla hava kabarcıkları çıkarıldı.

### 3.4. Biyokimyasal Analiz

Analiz için yavru sıçanlar bir gece boyunca aç bırakıldı. Ertesi gün sabah biyokimya tüplerine kan örnekleri alındı. Test tüpleri oda ısısında 3000x g.'de 10 dk. santrifüj (Shimadzu UV160A, SNo: 28006648, Japonya) edildi ve serum örnekleri ayrılarak -80 °C'de buzdolabında saklandı.

#### 3.4.1. Serum Östradiol Seviyesinin Ölçümü

Östradiol konsantrasyonları “Rat Östradiol (E2) ELISA Kit” (Cusabio Biotech Co. Ltd., Cat No. CSB-E05110r) ticari kiti kullanılarak kompetitif inhibisyon enzim immunoassay yöntemi kullanılarak belirlendi. Kullanılan kitte mikroplate kuyucukları, goat-anti-rabbit antikor ile kaplanmıştı. Analizde kullanılan reaktifler aşağıdaki gibidir

**Standartlar:** 0 pg/mL, 24 pg/mL, 60 pg/mL, 144 pg/mL, 240 pg/mL, 600 pg/mL konsantrasyonlarında 6 adet standart

**Antikor:** 1 adet 6 ml

**HRP-konjugat:** 1 adet 6 ml

**Yıkama solüsyonu:** 15 ml yıkama solüsyonu (20x) distile su ile dilüe edildi ve 300 ml yıkama solüsyonu hazırlandı.

**Substrat A:** 1 adet 7 ml

**Substrat B:** 1 adet 7 ml

**Durdurucu Solüsyon:** 1 adet 7 ml

#### 3.4.2. Deneysel İşlemler

Standart ve numune örneklerimizin her biri kendilerine ait kuyucuklara 50µl olacak şekilde pipetlendi. Daha sonra blank hariç tüm kuyucuklara 50 µl Horse-Radish peroksidaz konjugat ve 50 µl spesifik antikor eklendi. Plate iyice karıştırıldıktan sonra adheziv strip ile kapatılarak +37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plate'in her bir kuyucuğu otomatik mikroplate yıkayıcı ile aspire edildi ve 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı, plate absorbent kağıt ile

kurulandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl substrat A ve substrat B eklendi ve plate iyice karıştırıldıktan sonra adheziv strip ile kapatılarak ışıktan korunarak karanlıkta +37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl durdurucu solüsyon pipetlendi ve 10 dk içinde TECAN marka micro plate okuyucu kullanılarak 450 nm. dalga boyunda absorbanslar okundu.

Standart örneklerinin her biri çift çalışılmıştır. Yüksek çıkan numuneler ½ dilüsyon ile tekrar çalışılarak konsantrasyonları belirlenmiştir.

Şıçan serum östradiol konsantrasyonları 6 adet standart değeri kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre hesaplandı ve konsantrasyonlar pg/mL olarak ifade edildi. Ticari kitin okuma aralığı 24-600 pg/mL olarak verilmiştir.

### **3.5. Stereolojik İşlemler**

Stereolojik çalışmalarda etkin ve tarafsız sonuçlar elde edilebilmesi için örnekleme stratejisi oldukça önemlidir. Uygun örnekleme stratejisi istenilen parametreye daha ekonomik ve kolay bir şekilde elde edilmesini sağlar. Çalışmada kullanılan hayvan sayısı, kesit sayısı, kesit alanlarının görüntülenmesi ve örnekleme şekli ilgili literatür doğrultusunda gerçekleştirildi (Gundersen ve Østerby, 1981; Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark., 1999).

Literatürde her grup için 5 adet hayvan kullanılmasının yeterli olduğu bildirilmektedir (Cruz-Orive ve Weibel, 1990). Aynı şekilde, çoğu stereolojik çalışmalar için her bir dokudan yaklaşık 7-10 adet kesit alınmasının yeterli olduğu belirtilmektedir (Gundersen ve Jensen, 1987; Pakkenberg ve Gundersen, 1988; Gundersen ve ark., 1999).

Çalışma, fiziksel disektör yöntemi doğrultusunda gerçekleştirildiğinden dolayı her bir gruba ait bloklar ardı ardına gelen kesit çiftleri haline dönüştürüldü. Kesit kalınlığı 5 µm olarak belirlendi. Bloktaki ovaryum dokusu tükeninceye kadar her 20. ve 21. kesit çiftleri lamlara alındı. Böylece kesit örnekleme fraksiyonu 1/20 oldu.

Kesit seviyesinde örnekleme stratejisi belirlendikten sonra ovaryum dokusuna ait her bir kesitte alan örneklemesinin yapılması ve sayım çerçevesinin büyüklüğü tespit edildi. Alan örnekleme şekli ve sayım çerçevesi büyüklüğü yine ilgili literatürdeki örnekleme (Pakkenberg ve Gundersen, 1988; Gundersen ve ark., 1999) stratejileri göze alınarak belirlenmiştir. İlgili literatürler ışığında kesit alanları 150-200 adet olacak

şekilde örneklendi. Her bir alanda 1-2 partikül sayılacak şekilde sayım çerçevesinin ebatları ayarlandı.

Çalışmada kullanılan alan örnekleme şekli Ayas ve ark. (2012) tarafından geliştirilen uygulamaya göre yapıldı. Kesit alanlarının örnekleme, oosit sayımı, folliküllerin hacim ölçümü bilgisayar ortamında gerçekleştirildi. Bu işlemleri yapmak için görüntü yakalama kartı (Pinnacle, Studio Movie Box Plus 710) olan bir bilgisayar ve buna bağlı bir mikroskop (Olympus BH-2, Japonya) ve kamera sisteminden (Panasonic F10 CCD) oluşan bir düzenek kullanıldı (Şekil 19).

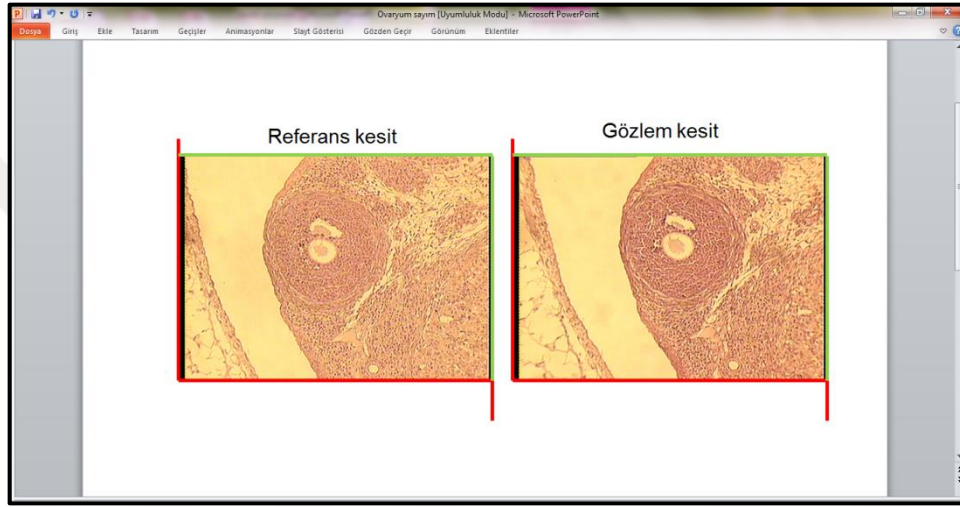


**Şekil 19.** Kesit örneklerinin değerlendirildiği, eşdeğer alanlarının kaydedildiği ve sayımın yapıldığı mikroskop ve bilgisayar düzeneği

### **3.5.1. Fiziksel Disektör ve Oosit Sayımı**

Fiziksel disektör kuralına göre hazırlanan ovaryuma ait preparatlarının görüntüleri bilgisayar monitörüne aktarıldı ve monitöre alan örnekleme asetatı yerleştirildi. Bu şekilde çalışılacak alanlar belirlendi. Örneklenen sayım alanları sırasıyla monitördeki asetatın orta noktasına getirildi ve 10x objektif büyütmesinde gözlem kesitinin görüntüsü elde edilerek resim formatında kaydedildi. Daha sonra referans kesitine geçildi ve eş değer alan bulunarak görüntüsü yine resim formatında kaydedildi. Bu işlem bütün alanlar örneklene kadar tüm preparatlara uygulandı.

Sayım işlemi bilgisayar ortamında gerçekleştirildi. Bunun için PowerPoint® programından yararlanıldı. Eş değer alanlardan oluşturulan görüntüler bu programda yan yana gelecek şekilde yerleştirildi. Sayım, tarafsız sayım çerçevesi (Gundersen, 1977) kuralları doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu kurala göre gözlem kesitinde yer alıp referans kesitinde yer almayan oosit izdüşümleri sayıldı. İzdüşümlerden sayım çerçevesinin sol ve alt kenarı ile bunları uzantılarına düşenler sayım dışı bırakılarak sağ ve üst kenarı ile çerçevenin içerisine düşen izdüşümler sayıma dahil edildi (Şekil 20).



**Şekil 20.** Disektör çiftlerine ait eşdeğer alanların eş zamanlı görüntülenip değerlendirilmesi işlemi PowerPoint® programında gerçekleştirildi.

Çalışmanın etkinliğini arttırmak için Gundersen (1986), Pakkenberg ve Gundersen'nin (1988) önerileri doğrultusunda disektör çiftleri ters çevrilerek de kullanıldı. Yani gözlem kesiti referans olarak alınırken, referans kesiti gözlem kesiti olarak alınmıştır. Böylece yaptığımız uygulamaya örneklemin bir katı kadar ilave farklı alanlar eklenmiş oldu. Bu sayede elde ettiğimiz toplam oosit sayısına ait hata katsayısının düşürülmesi sağlandı.

Sayım işlemi disektör-Cavalieri uygulaması (Pakkenberg ve Gundersen 1988) prensibine göre gerçekleştirildiğinden, obje yoğunluğu ( $N_v$ ) ile referans hacminin ( $V_{ref}$ ) aynı kesitlerden elde edilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak ilgili kesitlerden fiziksel disektörle hesaplanan obje yoğunluğu ( $N_v$ ) ile, Cavalieri metodu ile yine ilgili kesitlerden hesaplanan yapının hacminin çarpılması sonucu toplam hücre sayısı elde

edilir ( $N = N_v \times V_{ref}$ ). Bu yaklaşım ile her iki değer aynı kesitten elde edildiğinden dokuda meydana gelen deformasyon toplam hücre sayısı hesaplanmasını etkilememektedir. Böylece toplam oosit sayısı (N) şu şekilde hesaplanır;

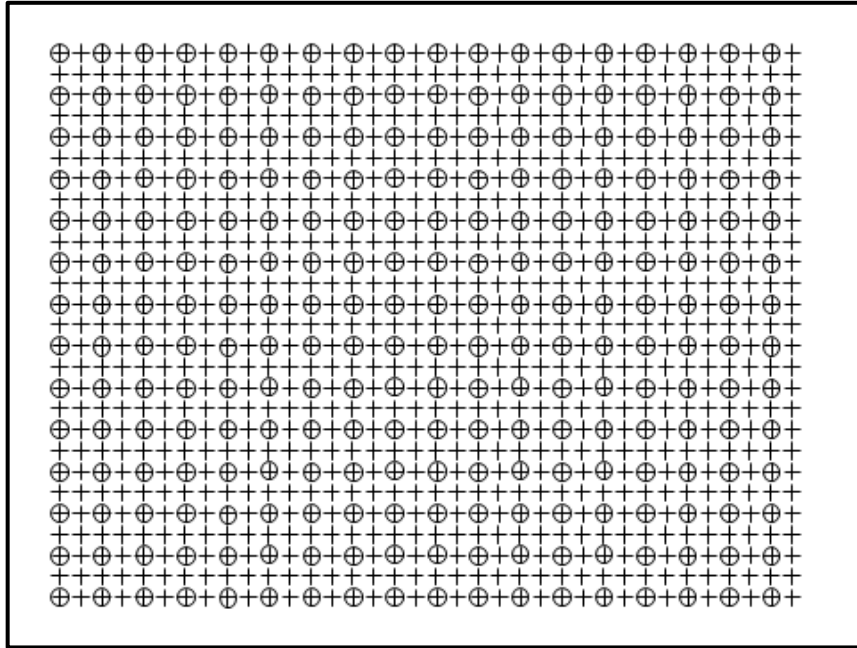
$$N = N_v \times V_{ref} = [\Sigma Q^- / t \times \Sigma a (\text{çerçeve})] \times [t \times k \times a/p \times \Sigma P]$$

Pay ve payda da aynı kesitten elde edildiğinden t (kesit kalınlığı) değeri sadeleşir ve formül şu şekilde olur;

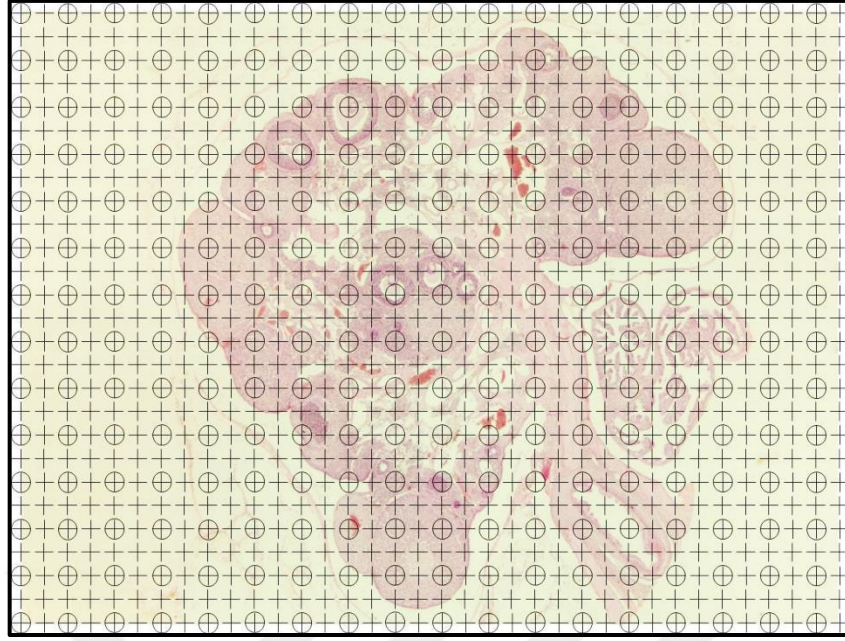
$$N = \bar{Q}^- \times \Sigma P \times k \times \frac{a/p}{a (\text{çerçeve})}$$

### 3.5.2. Ovaryum ve Foliküllerin Hacim Ölçümü

Cavalieri yöntemi dokuların ve organların hacimlerinin hesaplanması için kullanılan bir metottur. Preparatlarda ovaryuma ait kesitlerin görüntüsü bilgisayara aktarıldıktan sonra ovaryum hacmini (korteks ve medulla) hesaplamak için noktalar içeren asetat şablonu bilgisayar monitörüne yerleştirildi. Korteks ve medulla üzerine düşen tüm noktalar ayrı ayrı sayıldı. Bu işleme her bir hayvandaki bütün kesit serileri bitene kadar devam edildi. Sayım alanları sırasıyla rasgele düşürülen bu asetattaki her bir nokta doku seviyesinde  $90000 \mu\text{m}^2$ 'lik alanı temsil etmektedir (şekil 21 ve 22).



Şekil 21. Ovaryum hacmini (korteks ve medulla) hesaplamak için kullanılan asetat şablonu



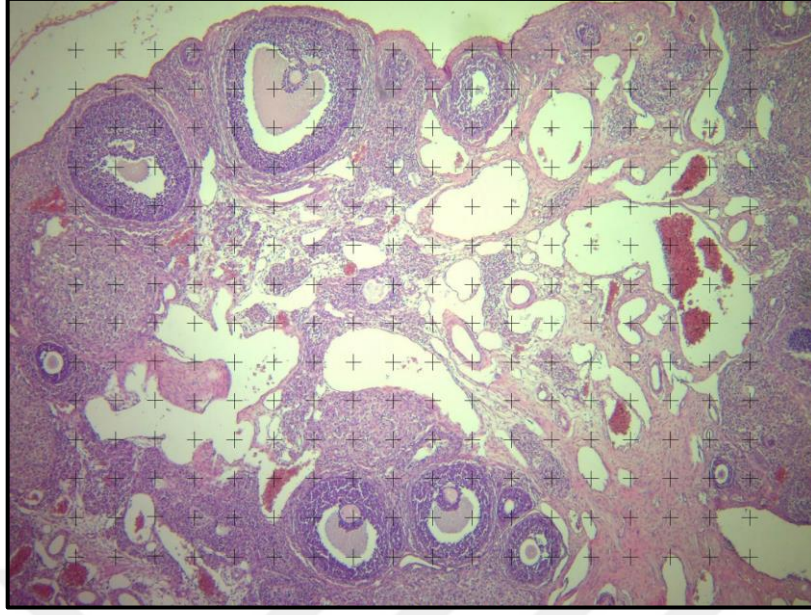
**Şekil 22.** Noktalı asetatın ovaryum kesitine uygulanması

Primer, sekonder ve tersiyer follüküllerin hacmini hesaplamak için mikroskop altına yerleştirilen ovaryum preparatına ait görüntü bilgisayar monitörüne aktarıldı. Monitörün ekranına yerleştirilen nokta asetatı ile her bir follükül üzerine düşen nokta ayrı ayrı sayıldı (Şekil 23). Bu işlem her bir hayvandaki bütün kesit serileri bitene kadar devam edildi. Bu değerlerin hesaplamasında her bir noktanın temsil ettiği alan (a/p); kontrol grubunda primer follükül için  $900 \mu\text{m}^2$ , sekonder ve tersiyer follükül için  $8100 \mu\text{m}^2$ , ilaç gruplarında ise primer follükül için  $900 \mu\text{m}^2$ , sekonder ve tersiyer follükül için  $3600 \mu\text{m}^2$  oldu. Hacim hesaplanmasında şu formül kullanıldı;

$$V = k \times t \times \Sigma P \times a/p$$

a/p, her bir noktanın doku seviyesinde karşılık geldiği alanı, 'k' kesitler arası mesafeyi gösterirken  $\Sigma P$ , kesit profiline düşen toplam nokta sayısını temsil etmektedir.





Şekil 23. Follikül hacimlerinin ölçümü için noktalı asetatın uygulanması

### 3.6. İstatistiksel Analiz ve Hata Katsayısının Bulunması

Gruplardan elde edilen verilerin karşılaştırılmasında, gruplar arası farklılığı değerlendirilmek için varyans analiz testlerinden ANOVA kullanılmıştır. Farklı çıkan verilerde ise çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi kullanıldı. Bu testler uygulanmadan önce verilere ait normallik testi Shapiro - Wilk, homojenlik testleri Levene ile gerçekleştirilmiştir.

Bununla birlikte; her bireyde SRÖ ile örneklenen kesitlerin yine SRÖ ile belirlenmiş alanlarda yapılan verilere ait hata katsayısı (CE) güncel yaklaşımlarla değerlendirildi. Bunun için Gundersen ve Jensen tarafından 1987 yılında gerçekleştirilen ve 1999'da gözden geçirilerek yeniden düzenlenen ve önerilen formül (Gundersen ve ark., 1999) kullanıldı.

$\Sigma Q^2$ 'ye ait hata katsayısı (CE; ortalamanın standart hatasının  $\Sigma Q^2$ 'ya oranı), toplam varyans (TV) karekökünün  $\Sigma Q^2$ 'ye bölünmesi ile elde edildi;

$$CE(Q^2 \text{ top}) = \sqrt{\text{Toplam Varyans} / \Sigma Q^2}$$

#### 4. BULGULAR

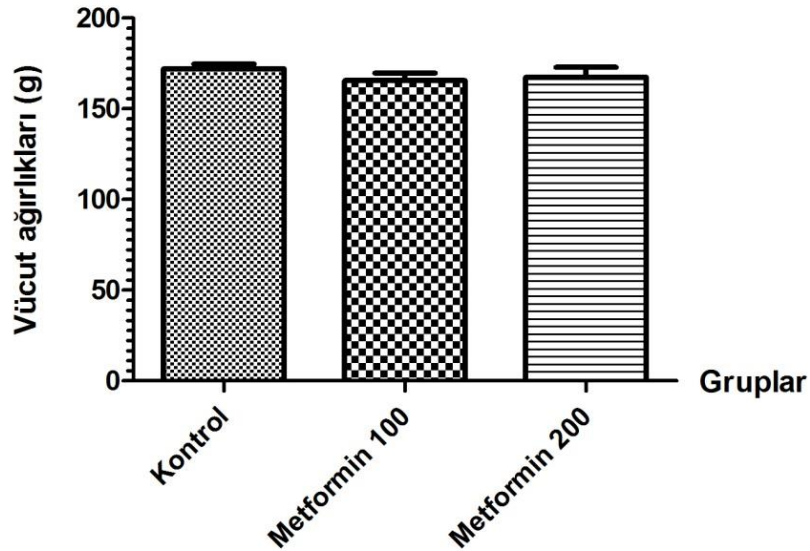
Çalışmamızın ilk basamağı olan dişi sıçanların gebe bırakılmasında herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır. Gebe sıçanların 21. günü civarında doğum yaptıkları görüldü. Yavru sıçanlarda belirgin bir malformasyon gözlenmedi. Perfüzyon işlemine geçmeden önce yavru sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Her bir grubun vücut ağırlıklarının ortalaması Tablo 4’de verilmiştir.

Çalışma sürecinde histolojik çalışma basamakları ve stereolojik uygulamalarda herhangi bir sorunla karşılaşılmaı. Kesit alımı sırasında kesit çiftlerinin aynı preparata alınması, fiziksel disektör uygulamasının en zor basamağı olarak görülen eş değer kesit alanlarının bulunup örnekleme işlemi başarılı gerçekleştirilmesini sağladı.

**Tablo 4.** Gruplara ait deneklerdeki ortalama vücut ağırlığı (ortalama±SD).

GRUPLAR			
	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
Vücut Ağırlıkları (g)	172±6,123	165,6±9,40	167,4±5,56

Gruplara ait ortalama vücut ağırlıkları ve standart sapmaları grafik halinde aşağıdaki Şekil 24’de verilmiştir.



**Şekil 24.** Gruplara ait ortalama vücut ağırlıkları (p>0,05)

Ortalama vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözükmemektedir ( $p>0,05$ ).

#### **4.1. Gruplardaki Deneklerin Ovaryumuna Ait Genel Yapısal Bulgular**

Gruplara ait ovaryum kesitlerinde mikroskopik olarak follikül sınıflandırılması aşağıda belirtilen özelliklere göre yapılmıştır.

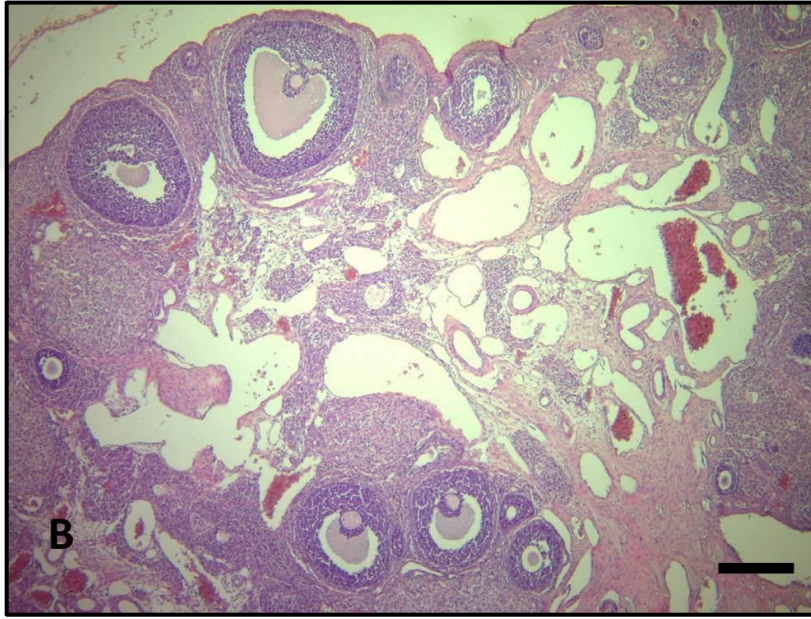
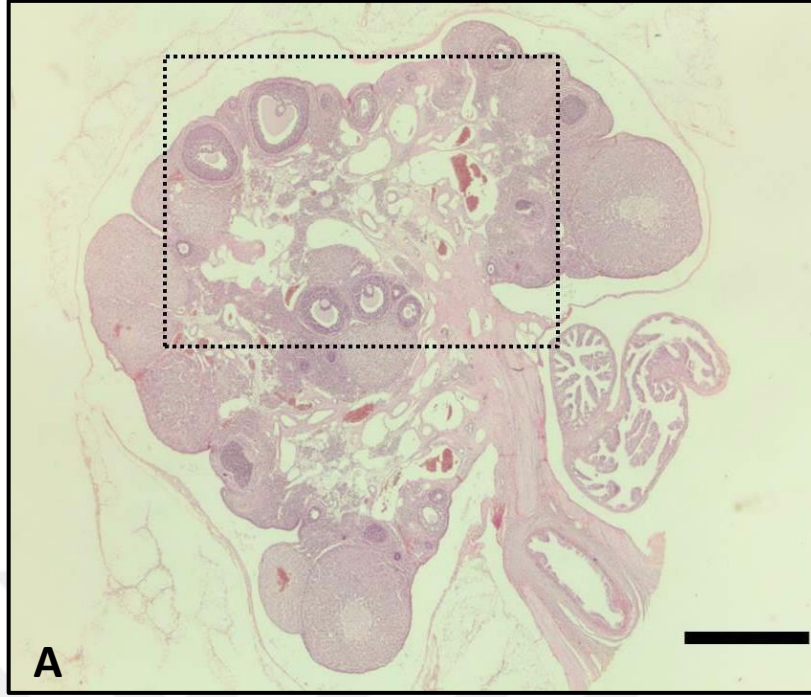
**Primordial follikül:** Oositin çevresinde tek katlı yassı hücre ile çevrili olan follikül.

**Primer follikül:** Oositin çevresinde tek katlı veya çok katlı kübik hücre ile çevrili olan follikül.

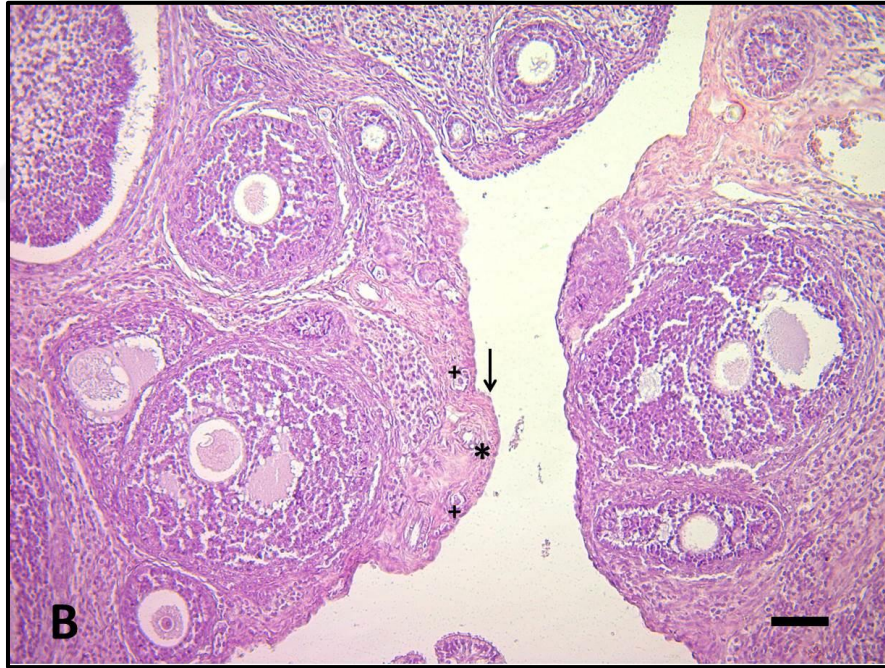
**Sekonder follikül:** Oositin çevresinde çok katlı prizmatik epitel ile çevrili olan ve granuloza hücreleri arasında follikül sıvısı olarak boşluk içeren follikül.

**Tersiyer follikül:** Oositi çevreleyen granuloza hücreleri arasındaki bağlantısı zayıflayan ve antrum hacmi en yüksek seviyeye ulaşan follikül.

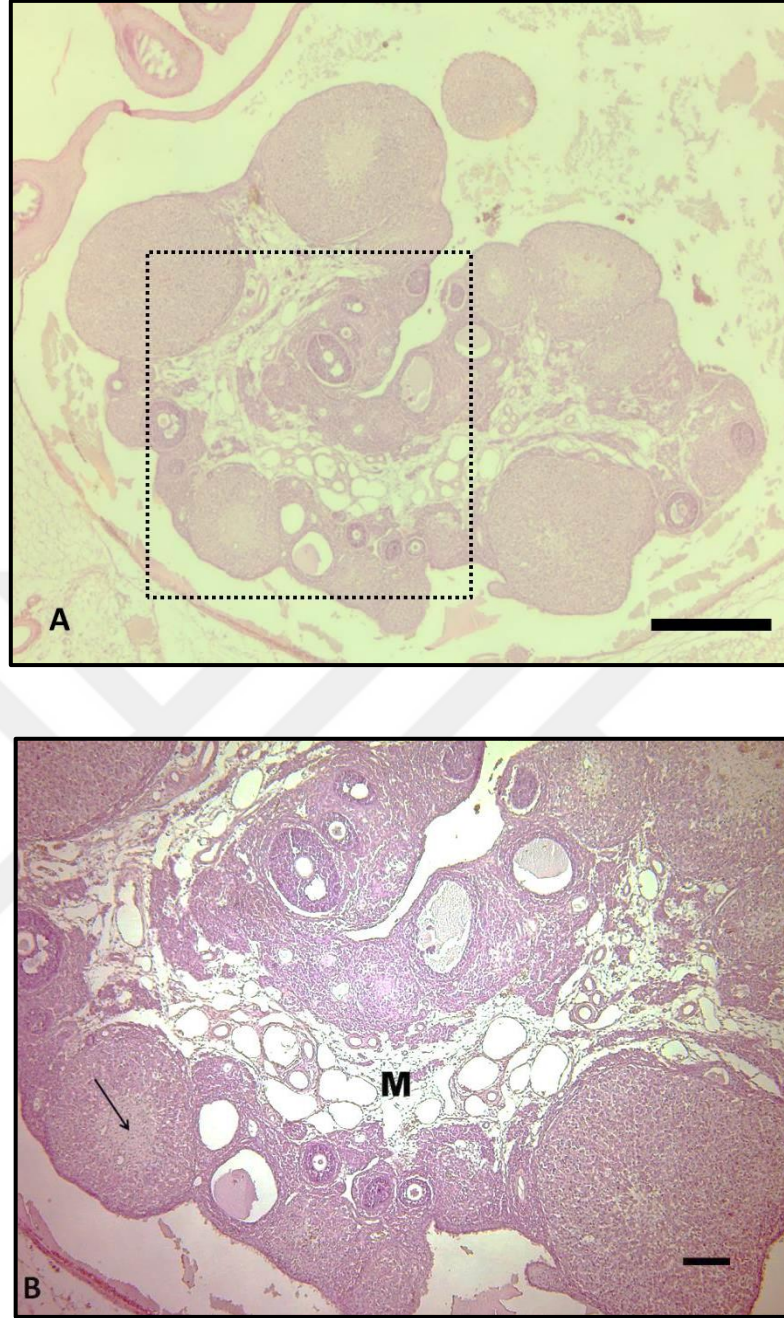
Ovaryumun genel düzeni açısından gruplar arasında histolojik olarak fark gözlenmedi (Şekil 25, 26, 27). Germinal epitel olarak adlandırılan over dokusunu çevreleyen tek katlı prizmatik epitelde herhangi bir mitotik figüre rastlanmadı. Kortekste dağınık olarak yerleşmiş folliküller normal görünüm göstermekteydi ve her seviyeye ait follikül bulunmaktaydı (Şekil 25B). Folliküllerde oval şekilli oositler gözlemlendi. Büyümekte olan folliküllerde oosit ve granuloza hücre tabakası arasında asodifilik karakterle gözlenen asellüler yapıda zona pellisuda bulunmaktaydı. Granuloza hücre tabakası ve stroma arasında, bağ dokusunun farklılaşması ile oluşan teka follikülü yine bu tip folliküllerde oluşmuştur (Şekil 28). Yine tüm grupların korteks tabakasında oldukça büyük çaplı korpus luteumlar görüldü. Korpus luteumlarda yer yer fibrotik doku dejenerasyonu, vakuolizasyonlar ve sıvı dolu kavite görüldü (Şekil 27B, 29). Medulla kısmında bol damarlanma gözlenirken herhangi bir yapısal bozukluk görülmedi (Şekil 27B).



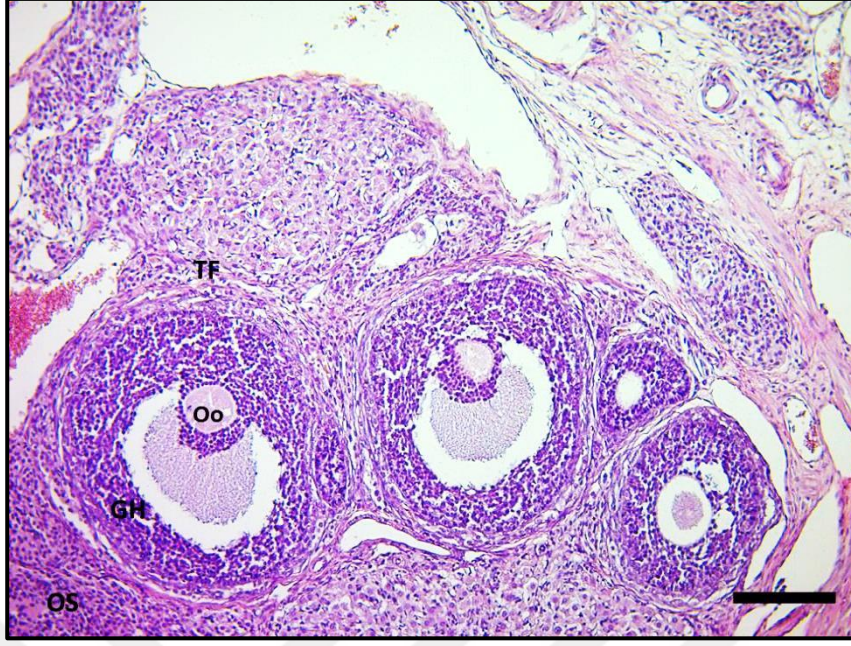
**Şekil 25. A:** Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü. **Bar:** 550  $\mu\text{m}$  **B:** A'da gözüken kareli alanın büyütülmüş hali. Korteks tabakasında dağınık olarak yerleşim gösteren farklı follikül tipleri görülmektedir. Medulla bölgesinde görülen damarlar normal görünüm sergilemekteydi. **Bar:** 100  $\mu\text{m}$



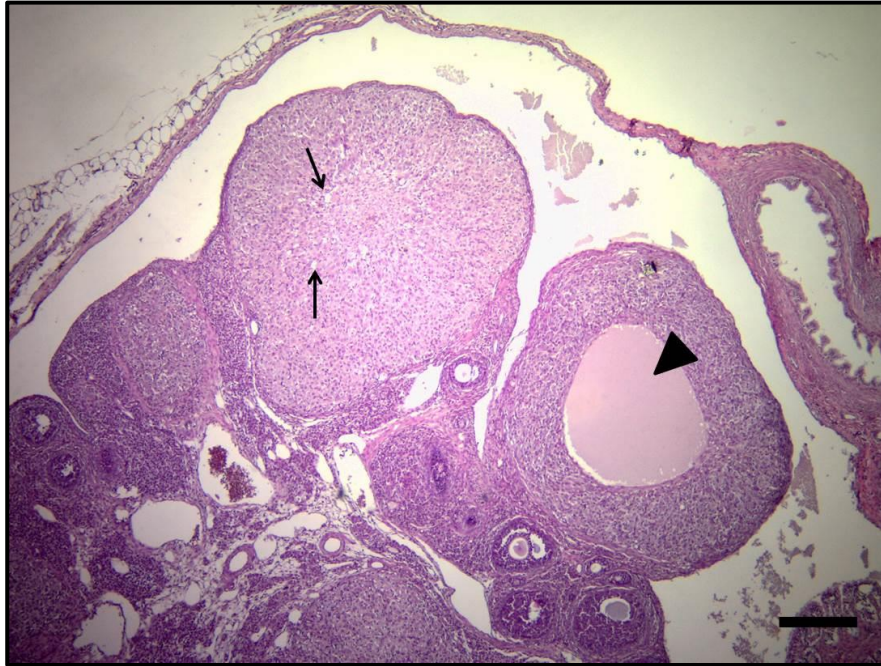
**Şekil 26. A:** Metformin 100 grubuna ait ovaryum dokusunun genel görüntüsü. **Bar:** 500µm. **B:** Şekil A'daki kareli alanın büyütülmüş hali. Germinal epitel (ok) altında bulunan Tunika albuginea (\*) tabakası. Primordial follüküller (+) germinal epitelin hemen altında dağılım gösterirken diğer seviyedeki follüküller korteks tabakasında dağınık halde bulunmaktadır. **Bar:** 100µm



**Şekil 27. A:** Metformin 200 grubuna ait ovariumun genel görüntüsü. **Bar:** 500  $\mu\text{m}$ . **B:** A'daki resmin büyütülmüş hali. Korpus luteumda fibrotik doku oluşumu (ok). Medulla bölgesinde (M) bol damarlanma görülmekte. **Bar:** 100 $\mu\text{m}$



**Şekil 28.** Ovaryum stroması (OS) içerisinde yer alan, normal görünümlü sekonder follikül merkezinde açık renkli homojen sitoplazması ile birlikte oosit (Oo) yer almakta, etrafını ise çok sayıda granuloza hücresi (GH) çevrelemektedir. Granuloza hücreleri ve stroma doku arasında, bağ dokusunun farklılaşması ile oluşan teka follikülü (TF) görülmektedir. **Bar:** 100µm



**Şekil 29.** Korpus luteumda görülen vakuolizasyon (oklar) ve sıvı dolu kavite (\*). **Bar:** 150 µm

#### 4.1.1. Oosit Sayısına Ait Bulgular

Ovaryum kesitlerinden elde edilen preparatlarda bulunan primer, sekonder, tersiyer follikülerdeki tüm oositler fiziksel disektör kuralına göre sayılıp toplam oosit sayısı elde edilmiştir. Her bir gruptaki denekler için ayrı ayrı yapılan bu işlem sonucunda elde ettiğimiz toplam oosit sayısının hesaplanmasında kullanılan toplam disektör çifti, oosit sayısı ve nokta sayısına ait veriler sırasıyla Tablo 5, 6, 7’de verilmiştir.

**Tablo 5.** Kontrol grubuna ait deneklerden elde edilen disektör çifti, oosit sayısı, nokta sayısı

<b>Kontrol Grubu</b>			
<b>Hayvan No</b>	<b>Disektör çifti</b>	<b>Sayılan oosit</b>	<b>Nokta sayısı</b>
1	300	118	84
2	278	208	310
3	268	138	269
4	384	166	293
5	326	120	282

**Tablo 6.** Metformin 100 grubuna ait deneklerden elde edilen disektör çifti, oosit sayısı, nokta sayısı

<b>Metformin 100 Grubu</b>			
<b>Hayvan No</b>	<b>Disektör çifti</b>	<b>Sayılan oosit</b>	<b>Nokta sayısı</b>
1	210	116	129
2	324	150	298
3	256	116	314
4	248	134	314
5	262	142	126

**Tablo 7.** Metformin 200 grubuna ait deneklerden elde edilen disektör çifti, oosit sayısı, nokta sayısı

<b>Metformin 200 Grubu</b>			
<b>Hayvan No</b>	<b>Disektör çifti</b>	<b>Sayılan oosit</b>	<b>Nokta sayısı</b>
1	162	92	240
2	258	122	276
3	342	82	468
4	252	154	227
5	284	122	239



Gruplardaki deneklerin her birinden elde edilen toplam oosit sayısı ve CE değerleri Tablo 8’de ayrı ayrı görülmektedir.

**Tablo 8.** Gruplara ait toplam oosit sayıları, CE değerleri

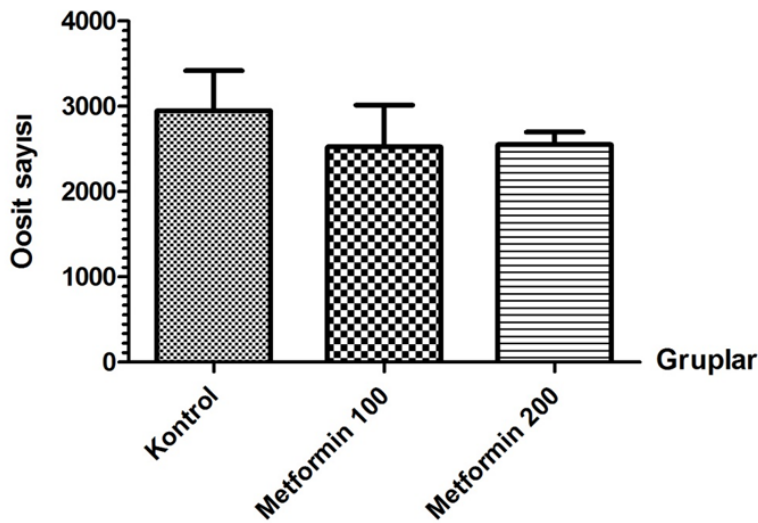
GRUPLAR						
Hayvan No	Kontrol	CE	Metformin 100	CE	Metformin 200	CE
1	2379	0,09	1466	0,09	2804	0,10
2	4771	0,07	2838	0,08	2685	0,09
3	2849	0,08	2927	0,09	2308	0,11
4	2606	0,07	3990	0,08	2854	0,08
5	2135	0,09	1405	0,08	2112	0,09

Tablo 9’da ise çalışmada kullanılan gruplara ait ortalama toplam oosit sayıları, SD ve CE değerleri ile birlikte verilmiştir.

**Tablo 9.** Gruplara ait ortalama toplam oosit ( N±SD) ve CE değerleri

Gruplar	N	CE
Kontrol	2948±1053,08	0,08
Metformin 100	2525±1093,55	0,08
Metformin 200	2553±325,96	0,09

Gruplara ait Tablo 9’da verilen değerlerin karşılaştırılması grafikler halinde Şekil 30’da standart sapmaları ile verilmiştir.



**Şekil 30.** Gruplara ait ortalama oosit sayısı (p>0,05)

Çalışma sonucu elde edilen ortalama oosit sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır ( $p>0,05$ ).

#### 4.1.2. Ovaryum, Korteks, Medulla Hacimlerine Ait Bulgular

Tüm gruplardaki deneklerin ovaryum, korteks ve medulla hacimlerine ait veriler CE değerleriyle birlikte sırasıyla Tablo 10, 11, 12’de verilmiştir (Verilen değerler ovaryumda doku takibi esnasında meydana gelebilecek büzüşme göz önüne alınmadan hesaplanmıştır).

**Tablo 10.** Kontrol grubuna ait ovaryum, korteks, medulla hacimleri ( $\text{mm}^3$ ) ve CE değerleri

Kontrol Grubu						
Hayvan No	Ovaryum	CE	Korteks	CE	Medulla	CE
1	10,59	0,05	8,78	0,06	1,80	0,07
2	11,16	0,06	9,61	0,06	1,54	0,08
3	9,67	0,06	7,88	0,07	1,79	0,08
4	12,38	0,05	10,54	0,05	1,83	0,07
5	10,15	0,06	8,60	0,07	1,54	0,08

**Tablo 11.** Metformin 100 grubuna ait ovaryum, korteks, medulla hacimleri ( $\text{mm}^3$ ) ve CE değerleri

Metformin 100 Grubu						
Hayvan No	Ovaryum	CE	Korteks	CE	Medulla	CE
1	4,63	0,09	3,63	0,10	0,99	0,09
2	10,71	0,06	8,24	0,07	2,46	0,06
3	11,31	0,05	10,11	0,06	1,19	0,09
4	12,92	0,05	11,23	0,06	1,69	0,08
5	4,51	0,09	3,71	0,10	0,81	0,11

**Tablo 12.** Metformin 200 grubuna ait ovaryum, korteks, medulla hacimleri (mm<sup>3</sup>) ve CE değerleri

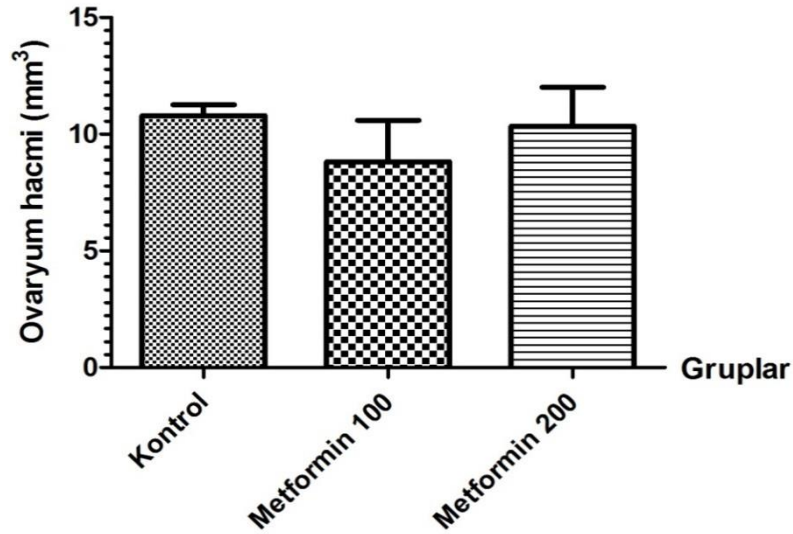
Metformin 200 Grubu						
Hayvan No	Ovaryum	CE	Korteks	CE	Medulla	CE
1	8,16	0,07	6,91	0,07	1,25	0,08
2	9,92	0,06	7,95	0,07	1,98	0,07
3	16,83	0,05	13,93	0,05	2,91	0,06
4	8,19	0,07	6,58	0,08	1,60	0,08
5	8,61	0,06	7,02	0,07	1,59	0,08

Tablo13’de ise çalışmada kullanılan grupların her birine ait ortalama ovaryum, korteks, medulla hacimleri, SD ve CE değerleriyle birlikte verilmiştir.

**Tablo 13.** Gruplara ait ortalama hacim, (ortalama hacim  $\pm$ SD) ve CE değerleri

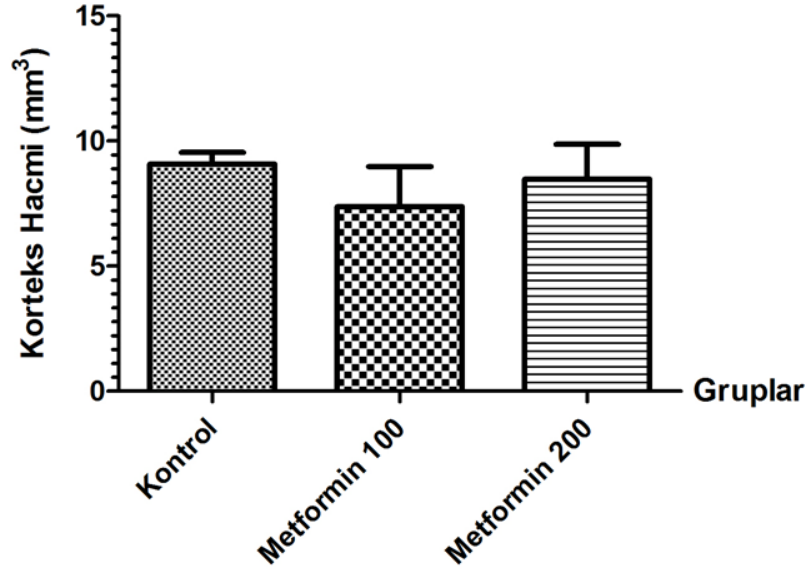
GRUPLAR	Ovaryum	CE	Korteks	CE	Medulla	CE
<b>Kontrol</b>	10,79 $\pm$ 1,04	0,06	9,09 $\pm$ 1,02	0,06	1,70 $\pm$ 0,14	0,07
<b>Metformin 100</b>	8,82 $\pm$ 3,96	0,07	7,38 $\pm$ 3,55	0,08	1,43 $\pm$ 0,66	0,09
<b>Metformin 200</b>	10,34 $\pm$ 3,69	0,06	8,48 $\pm$ 3,09	0,07	1,87 $\pm$ 0,64	0,07

Gruplara ait Tablo 13’de verilen değerlerin karşılaştırılması grafikler halinde standart sapmaları ile birlikte sırasıyla Şekil 31, 32, 33’de verilmiştir.



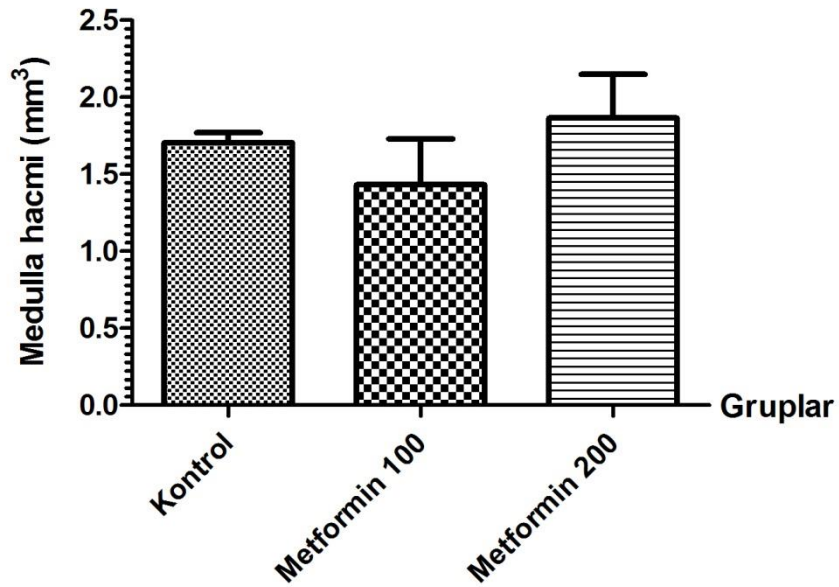
**Şekil 31.** Gruplara ait ortalama ovaryum hacimleri ( $p>0,05$ )

Ortalama ovaryum hacimleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmadı ( $p>0,05$ ).



Şekil 32. Gruplara ait ortalama korteks hacimleri ( $p>0,05$ )

Ortalama korteks hacimleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmadı ( $p>0,05$ ).



Şekil 33. Gruplara ait ortalama medulla hacimleri ( $p>0,05$ )

Ortalama medulla hacimleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmadı ( $p>0,05$ ).

#### 4.1.3. Follikül Hacimlerine Ait Bulgular

Tüm gruplardaki deneklere ait ışık mikroskopik kesitleri üzerinden yapılan primer, sekonder, tersiyer follikül hacim hesaplamalarına ait veriler CE değerleriyle birlikte sırasıyla Tablo 14, 15, 16'da verilmiştir (Verilen değerler ovaryumda doku takibi esnasında meydana gelebilecek büzüşme göz önüne alınmadan hesaplanmıştır).

**Tablo 14.** Kontrol grubuna ait primer, sekonder, tersiyer follikül hacimleri ( $\text{mm}^3$ ) ve CE değerleri

Kontrol Grubu						
Hayvan No	Primer follikül hacmi	CE	Sekonder follikül hacmi	CE	Tersiyer follikül hacmi	CE
1	0,013	0,08	0,061	0,12	0,020	0,20
2	0,017	0,07	0,064	0,12	0,085	0,09
3	0,027	0,06	0,102	0,09	0,058	0,11
4	0,009	0,09	0,105	0,09	0,083	0,09
5	0,025	0,06	0,106	0,08	0,044	0,13

**Tablo 15.** Metformin 100 grubuna ait primer, sekonder, tersiyer folikül hacimleri ( $\text{mm}^3$ ) ve CE değerleri

Metformin 100 Grubu						
Hayvan No	Primer follikül hacmi	CE	Sekonder follikül hacmi	CE	Tersiyer follikül hacmi	CE
1	0,021	0,07	0,074	0,07	0,050	0,09
2	0,020	0,07	0,057	0,08	0,045	0,09
3	0,016	0,08	0,060	0,08	0,032	0,11
4	0,019	0,07	0,047	0,09	0,003	0,32
5	0,008	0,02	0,051	0,09	0,032	0,11

**Tablo 16 .** Metformin 200 grubuna ait primer, sekonder, tersiyer follikül hacimleri (mm<sup>3</sup>) ve CE değerleri

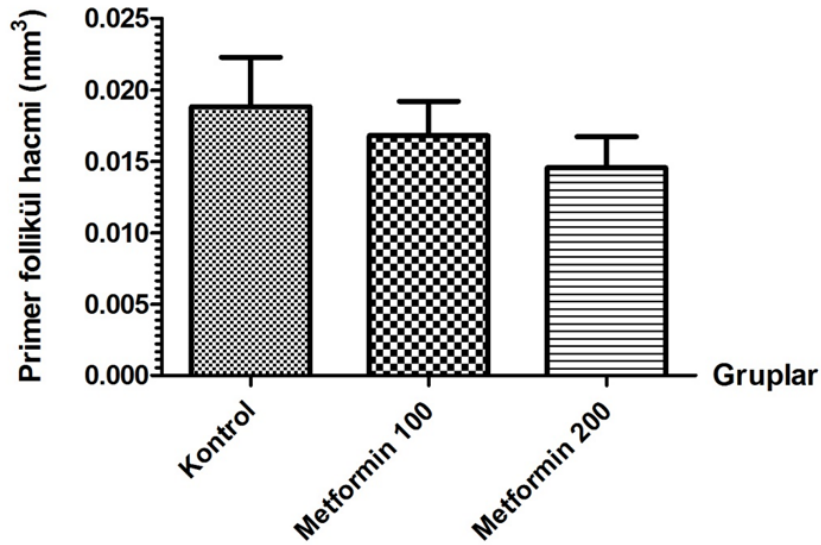
<b>Metformin 200 Grubu</b>						
<b>Hayvan No</b>	<b>Primer follikül hacmi</b>	<b>CE</b>	<b>Sekonder follikül hacmi</b>	<b>CE</b>	<b>Tersiyer follikül hacmi</b>	<b>CE</b>
<b>1</b>	0,016	0,08	0,048	0,08	0,008	0,21
<b>2</b>	0,017	0,07	0,039	0,09	0,025	0,12
<b>3</b>	0,021	0,06	0,097	0,06	0,003	0,32
<b>4</b>	0,009	0,09	0,062	0,07	0,032	0,10
<b>5</b>	0,009	0,09	0,071	0,07	0,034	0,11

Tablo 17’de ise her bir gruba ait ortalama toplam primer, sekonder, tersiyer follikül hacimleri, SD ve CE değerleriyle birlikte verilmiştir.

**Tablo 17.** Gruplara ait ortalama follikül hacimleri, (ortalama hacim  $\pm$ SD) ve CE değerleri

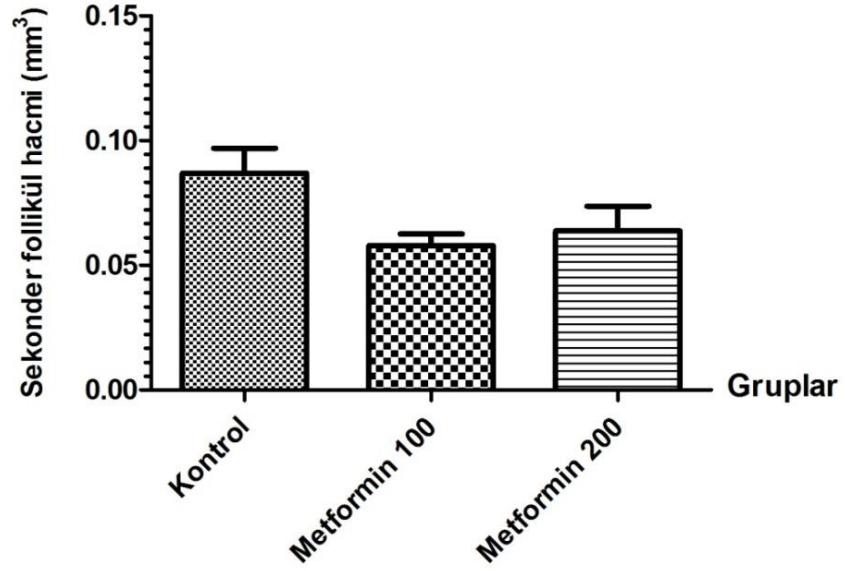
<b>GRUPLAR</b>	<b>Primer follikül hacmi</b>	<b>CE</b>	<b>Sekonder follikül hacmi</b>	<b>CE</b>	<b>Tersiyer follikül hacmi</b>	<b>CE</b>
<b>Kontrol</b>	0,018 $\pm$ 0,008	0,07	0,087 $\pm$ 0,022	0,10	0,058 $\pm$ 0,027	0,13
<b>Metformin 100</b>	0,017 $\pm$ 0,005	0,08	0,058 $\pm$ 0,010	0,08	0,032 $\pm$ 0,018	0,14
<b>Metformin 200</b>	0,015 $\pm$ 0,005	0,08	0,064 $\pm$ 0,022	0,08	0,020 $\pm$ 0,014	0,17

Gruplara ait Tablo 17’de verilen değerlerin karşılaştırılması grafikler halinde standart sapmaları ile birlikte sırasıyla Şekil 34, 35, 36’da verilmiştir.



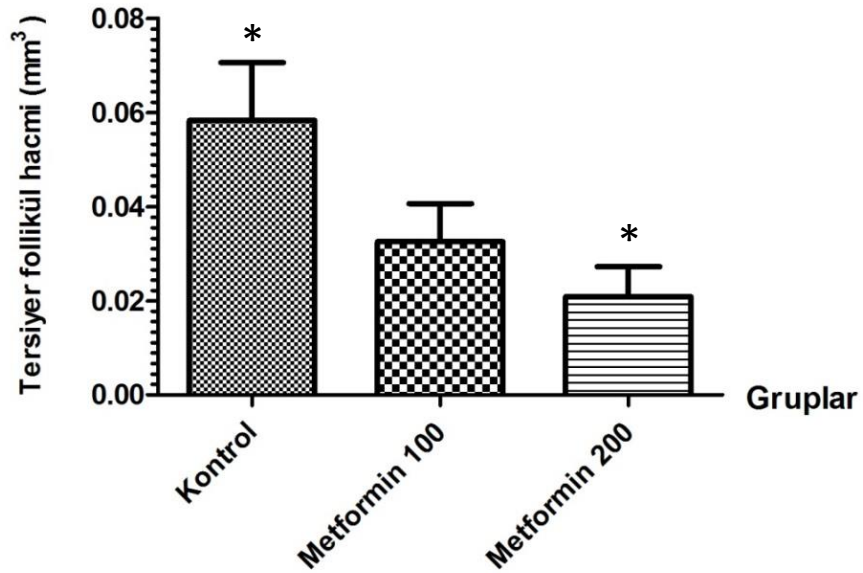
**Şekil 34.** Gruplara ait ortalama primer follikül hacmi ( $p>0,05$ )

Ortalama primer follikül hacimleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ).



Şekil 35. Gruplara ait ortalama sekonder hacmi ( $p>0,05$ )

Ortalama sekonder follikül hacimleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ).

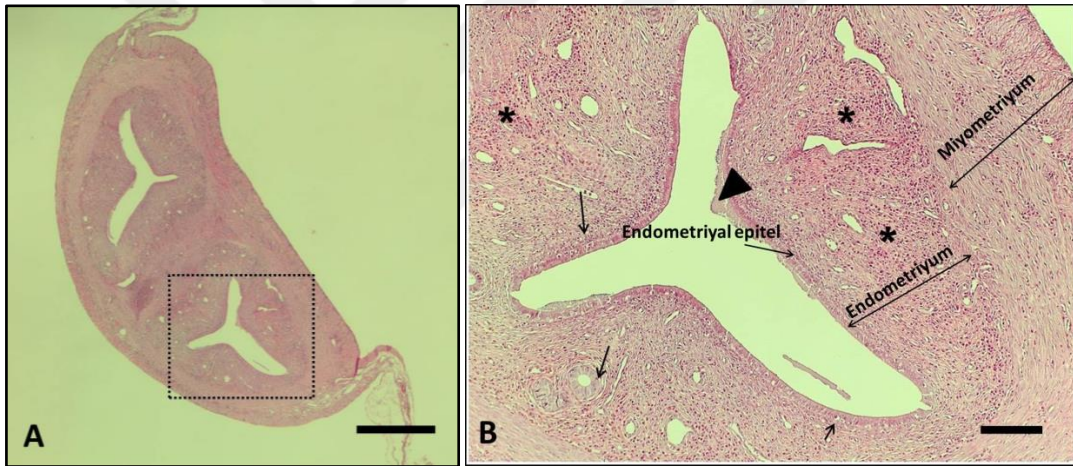


Şekil 36. Gruplara ait ortalama tersiyer hacmi (\* $p<0,05$ )

Metformin 200 grubunun ortalama tersiyer follikül hacmi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gösterdi ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2. Gruplardaki Deneklerin Uterusuna Ait Genel Yapısal Bulgular

Tüm gruplarda uterusun tek katlı silyalı prizmatik epitelde döşeli olduğu gözlemlendi. Yer yer mukoid tabakada görülmekteydi. Endometriyal epitel ve bezlerde mitotik figürlere rastlandı. Endometriyumda bol damarlanma ve lökosit infiltrasyonu tüm gruplarda benzer yoğunlukta gözlemlendi. Uterusun tabakalarından olan miyometriyumda herhangi bir yapısal bozukluk görülmedi (Şekil 37).



**Şekil 37.** **A:** Kontrol grubuna ait uterus görüntüsü. **Bar:** 500  $\mu$ m. **B:** A'da gözükten kareli alanın büyütülmüş görüntüsü. Uterus bezlerinde ve endometriyal epitelde görülen mitotik figürler (oklar). Endometriyal epitelde gözlenen mukoid tabaka (ok başı). Lökosit infiltrasyonunun gözlemlendiği endometriyum tabakası (\*). **Bar:** 100  $\mu$ m



#### 4.2.1. Endometriyum Kalınlıklarına Ait Bulgular

Gruplardaki her bir denekten elde edilen endometriyum kalınlıkları Tablo 18’de verilmiştir.

**Tablo 18.** Gruplara ait endometriyum kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ )

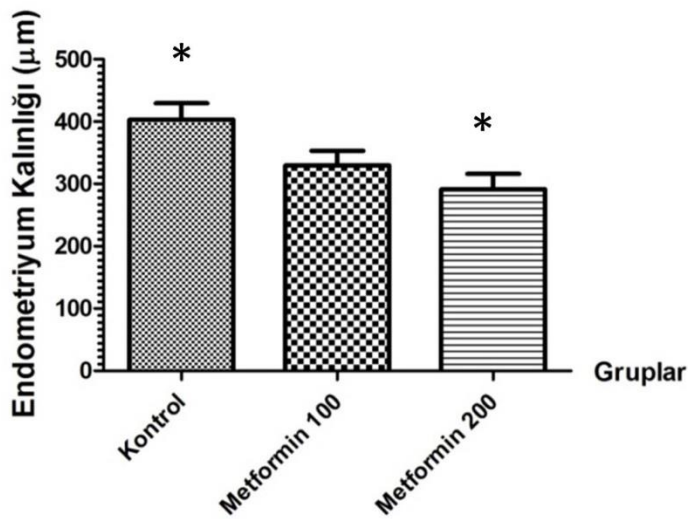
GRUPLAR			
Hayvan No	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
1	324	333	293
2	388	382	221
3	476	372	372
4	441	311	300
5	387	250	272

Tablo 19’da ise gruplara ait ortalama endometriyum kalınlıkları verilmiştir.

**Tablo 19.** Gruplara ait ortalama endometriyum kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ ) ve  $\pm\text{SD}$  değerleri

Gruplar	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
	403,2 $\pm$ 58,03	329,6 $\pm$ 53,00	291,6 $\pm$ 54,55

Gruplara ait Tablo 19’da verilen değerlerin karşılaştırılması grafik halinde standart sapması ile birlikte Şekil 38’de verilmiştir.



**Şekil 38.** Gruplara ait ortalama endometriyum kalınlıkları (\* $p < 0,05$ )

Ortalama endometriyum kalınlığına bakımından Metformin 200 grubunda, Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p > 0,05$ ).

Gruplardaki her bir denegin endometriyal epitel kalınlıkları ve ortalama epitel kalınlıkları sırasıyla Tablo 20 ve 21’de verilmiştir.

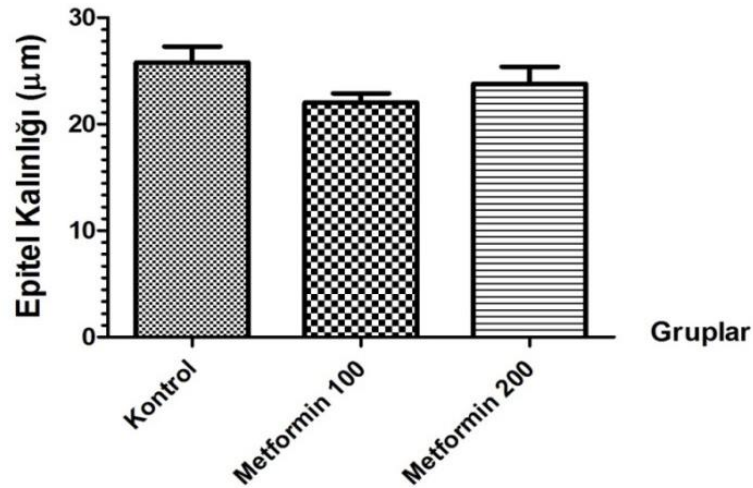
**Tablo 20.** Gruplara ait endometriyal epitel kalınlıkları ( $\mu\text{m}$ )

GRUPLAR			
Hayvan No	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
1	23	25	21
2	22	23	23
3	30	21	22
4	28	21	30
5	26	20	23

**Tablo 21.** Gruplara ait ortalama epitel kalınlığı ( $\mu\text{m}$ ) ve  $\pm$  SD

Gruplar	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
	25,8 $\pm$ 3,35	22 $\pm$ 2,00	23,8 $\pm$ 3,56

Gruplara ait Tablo 21’de verilen değerlerin karşılaştırılması grafik halinde standart sapmaları ile birlikte Şekil 39’da verilmiştir.



**Şekil 39.** Gruplara ait ortalama epitel kalınlığı ( $p > 0,05$ )

Ortalama epitel kalınlığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0,05$ ).

### 4.3. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda dişi sıçanlardan alınan kanlardan biyokimyasal analiz sonucu ölçülen gruplara ait östradiol seviyeleri, ortalama östradiol seviyeleri ve  $\pm$  SD değerleri sırasıyla Tablo 22, 23’de verilmektedir.

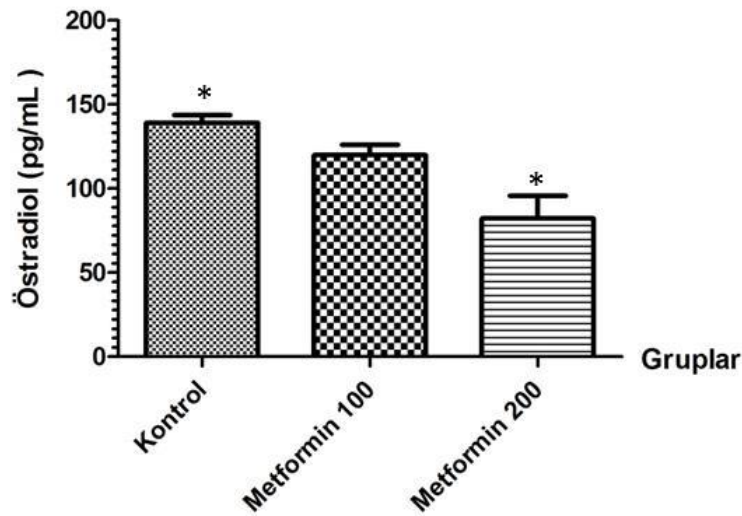
**Tablo 22 .** Gruplara ait östradiol seviyeleri (pg/mL)

Hayvan No	GRUPLAR		
	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
1	143,81	105,85	109,53
2	153,44	120,70	30,57
3	133,79	127,01	85,18
4	138,50	107,07	94,60
5	126,03	138,67	91,53

**Tablo 23.** Gruplara ait ortalama östrodiol seviyeleri (pg/mL) ve  $\pm$ SD değerleri.

Gruplar	Kontrol	Metformin 100	Metformin 200
Ortalama östradiol	139,11 $\pm$ 10,33	119,86 $\pm$ 13,83	82,28 $\pm$ 30,25

Gruplara ait Tablo 23’de verilen değerlerin karşılaştırılması standart sapmaları ile birlikte Şekil 40’da grafik halinde verilmiştir.



**Şekil 40.** Gruplara ait ortalama östradiol değerleri (\*p<0,05)

Ortalama östradiol seviyeleri açısından Metformin 200 grubunda, Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p>0,05$ ).



## 5. TARTIŞMA

T2D ve PKOS'lu hastaların tedavisinde metformin yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki hastalıkta da insülin direncine bağlı olarak meydana gelen hiperinsülinemisinin sonuçlarından bir tanesi de ovulasyon bozukluğudur (Sabatini ve ark., 2011). Ayrıca bu durum endometriyum fonksiyonlarını ve endometriyum çevresini olumsuz etkilemektedir. Hiperinsülinemi, SHGB seviyesini azaltarak serbest östrojen seviyesini yükseltmekte, ayrıca insülin endometriyum hücrelerindeki insülin reseptörlerine bağlanarak endometriyal proliferasyona neden olmakta ve bu durum endometriyum kanser riskinin arttırmaktadır. Endometriyumun olumsuz yönde etkilendiği diğer bir durum ise yüksek androjen seviyesidir. PKOS'lu bayanların büyük bir kısmında görülen aşırı androjen üretimi endometriyal hücrelerin büyümesini ve salgısını inhibe etmektedir. Bu durum PKOS'lu bayanlarda endometriyum kanserine, endometriyozise neden olmaktadır (Elia ve ark., 2009).

PKOS, üreme çağındaki bayanların yaklaşık %5-7'sinde görülmektedir (Sabatani ve ark., 2011). Bu bayanlar sağlıklı bayanlara göre gebelik boyunca erken gebelik kaybı ve gebelik diyabeti gibi sorunlar yaşamaktadırlar. PKOS'lular da gebelik boyunca metformin kullanılarak yapılan çalışmalarda, metforminin erken gebelik kaybını ve gebelik diyabetini önlediği gösterilmiştir. Ayrıca düşük oranlarının azalmasında ve fetal büyüme kısıtlılığının önlenmesinde yararlı olduğu görülmüştür (Kumar ve Khan, 2012). Bu nedenle hem diyabetik hem de PKOS'lu bayanlarda metformin, gebelik öncesi ve gebelikte tedavi edici ajan olarak tercih edilmektedir (Simmons, 2010). Yine PKOS'lu bayanlarda yapılan çalışmalarda metforminin ovaryum hacmini azalttığı, oosit sayısını arttırdığı gözlenmiştir. Bu hastalarda metformin kullanımı menstruasyonu düzenlediği, ovulasyon oranını arttırdığı, androjen seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Metforminin endometriyumun kalın olduğu olgularda bu kalınlığı azalttığı bildirilmiştir. Bu olguların ortak noktası yüksek östrojen seviyelerinin bulunmasıdır ve ortak tedavi yöntemi östrojen seviyesinin düşürülmesidir (Kumar ve Khan, 2012; Lautatiz ve ark., 2013).

Östrojenlerin kadın üreme sistemi üzerinde önemli yapısal ve işlevsel etkileri bulunmaktadır. En önemli fonksiyonları, hücre çoğalmasını arttırarak cinsiyet organlarının, üreme ile ilgili diğer dokuların gelişimini ve büyümesini sağlamak, sekonder cinsiyet karakterlerini geliştirmek ve menstruasyonu başlatarak düzenli

şekilde devam ettirmesini sağlamaktadır. Ergenlik döneminde sentez ve salınımı, iç ve dış genital organların büyüyerek gelişmesine neden olmaktadır. Ayrıca endometriyumda da çoğalmayı uyararak bağ dokunun, kan damarlarının ve salgı bezlerinin artışı sağlamaktadırlar. Gebe olmayan bayanlarda östrojenlerin büyük bir kısmı ovaryumlarda, geri kalan kısmı ise periferik dokularda sentezlenmektedir. Gebe bayanlarda ise ovaryumlarda minimal düzeyde sentezlenirken, fetal dokular östrojenin ana kaynağı haline gelmektedir. Fetoplental dokunun normal fizyolojik fonksiyonu gereği, östradiol daha fazla miktarda sentezlenmektedir (Türköz ve Çilek, 2011). Östrojen, oositin fertilizasyonunda ve embriyo gelişiminde gereklidir. Gebelik boyunca gelişen fetus için gerekli olan uterus ortamının devamlılığına yardımcı olur (Bonderssan ve ark., 2014). Metforminin kullanılmasının, östrojen üretimi üzerindeki etkileri göze alındığında, (ayrıca bakınız 'Giriş' sayfası 1), gebelik esnasında yavruya nasıl bir etki göstereceği araştırılması gereken durumlardan birisidir.

Serum östrojen seviyesi follikül boyutundaki büyüme ve granuloza hücre sayısındaki artışa bağlı olarak yükselmektedir. Şöyle ki; siklus başlangıcında preantral folliküllerdeki granuloza hücrelerinde FSH reseptörleri FSH'nın etkisiyle artmaktadır. Aynı zamanda LH'nın etkisiyle teka hücrelerinden androjenler üretilmekte ve granuloza hücrelerindeki aromataz aktivitesi ile östradiole çevrilmektedirler. Artan FSH ve östradiol etkisiyle granuloza hücreleri proliferasyon olmaktadır ve antral follikül şekillenerek gelişen follikül büyümesini sürdürmektedir. Follikülün büyümeye devam etmesi ve östradiol ile inhibin B salgılaması FSH salınımı baskılanmasına neden olmaktadır. Yüksek düzeydeki östradiolün ardından LH sıçramasıyla ovulasyon gerçekleşmektedir. Metformin follikül büyümesine doğrudan veya dolaylı olarak etki etmektedir. Aromataz aktivitesi ve granuloza hücrelerindeki LH ve FSH reseptör oluşumu üzerine muhtemel inhibisyon etkisi ve ayrıca AMPK aktivasyonu aracılığıyla steroid sentezini azaltması bu etkileri arasındadır (Franks ve ark.,1999; Mansfield ve ark., 2003; Rice ve ark., 2005; Hawthorne, 2006; Takemura ve ark., 2006; Rice ve ark., 2013). Bunun sonucunda östradiol salınımında düşüş ve granuloza hücre sayısında da azalma beklenir. Yaptığımız çalışmada da bu etki gözlemlenmiş, kontrol grubuna göre diğer çalışma gruplarında östradiol seviyesi düşmüş, bu düşüş yüksek doz uygulanan grupta anlamlı seviyede çıkmıştır ( $p < 0,05$ ). Ayrıca benzer etki tersiyer follikül hacminde de görülmüştür metforminin yüksek doz uygulandığı grupta kontrol grubuna göre anlamlı

bir düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu durumun muhtemelen yavru sıçanların over rezervindeki mevcut follikülerin oluşumu ve gelişimi esnasında gonadotropin reseptörlerin etkilenmesiyle ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Rice ve ark., 2005)

Bonderssan ve ark.'nın (2014) maymunlarda aromataz inhibitörleri kullanılarak yapmış olduğu çalışmada, aromataz inhibitörü verilen grupta ciddi östrojen eksikliği görülmüş ve primordial follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Bununla birlikte primer follikül sayısı deney grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüş ve bunu FSH'nin etkisine bağlamışlardır. Yine aynı çalışmada östrojen yokluğunda folliküler de bol granuloza hücreleri gözlenmiş, antrum ve korpus luteumun oluşmadığı görülmüştür.

Sunulan bu çalışmada toplam oosit sayısı da karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında bu parametre için anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Bu durum aynı zamanda kullanılan etken maddenin intrauterin dönemde yumurta oluşumu ve gelişimi üzerine toksik bir etkisinin olmadığı fikrini verebilmektedir. Bu parametre bakımından diğer çalışmalarla doğrudan karşılaştırma yapma imkanı olmamıştır. Yukarıda bahsedildiği üzere, literatüre bakıldığında yapılan çalışmaların deneysel olarak oluşturulan modeller üzerinde yapıldığı ve doğrudan yetişkinlere uygulanıp değerlendirildiği görülmektedir. Nitekim Sabatini ve ark. (2011), metforminin oosit sayısına etkisini incelemek için PKOS modeli oluşturulmuş mutant murin sıçanlarda çalışmışlardır. Tedavi grubuna 7 hafta boyunca her gün oral yolla 0,1 mg/ml metformin verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında olgun oosit sayısının 1,77 kat, toplam oosit sayısının ise 1,51 kat arttığı gözlenmiştir. Follikül ve oosit sayısının değerlendirildiği bir başka çalışmada Stadtmauer ve ark. (2001) tarafından yapılmıştır. PKOS'lu bayanlara günde iki kere 500 mg metformin IVF sikluslarının başında uygulamaya başlanmış ve gebelik testi zamanına kadar verilmiştir. Üç ay boyunca uygulanan tedavi sonucunda metformin kullanan bayanlarda, kullanmayanlara göre follikül sayısı önemli derecede düşmüş, olgun oosit sayısı ise artış göstermiştir.

Oosit sayısının yanı sıra çalışmamızda ovaryum ile korteks ve medulla hacimleri de değerlendirilmiş, bu parametreler açısından kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Tersiyer follikül hacminde çıkan fark, korteks ve ovaryum hacimlerini etkilemediği görülmektedir. Bu sonuç muhtemelen, toplam tersiyer follikül hacminin nispi olarak kortekste dolayısıyla

ovaryumda daha az yer tutmasından kaynaklanabilir. Bu parametreler açısından da yine doğrudan karşılaştırma yapabileceğimiz bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışma yine yetişkinlerle sınırlı kalmıştır. Over hacmi açısından PKOS'lu hastalarda metforminin faydalarını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Sanoee ve ark.'nın (2011) PKOS'lu bayanlara günde üç kez 500 mg metformin 3 ay boyunca uygulamıştır. Üçüncü ayın sonunda ovaryum hacimlerinde kontrol grubuna göre önemli derecede azalma gözlemlenmişlerdir. Yine ovaryum hacminin değerlendirildiği başka bir çalışma Falbo ve ark. (2009) tarafından PKOS'lu hastalarda yapılmıştır. Hastaların bir kısmına 6 ay boyunca günde iki tablet (her bir tablet 850 mg) metformin verilmiştir. Çalışmanın sonunda metformin uygulanan grubun ovaryum hacmi, tedavi edilmeyen gruba göre önemli ölçüde azalmıştır ( $p<0,05$ ).

Yapılan çalışma endometriyum ve epitel kalınlığı açısından değerlendirildiğinde, yavru sıçanlarda endometriyal epitel kalınlıkları bakımından gruplar arasında fark çıkmamıştır ( $p>0,05$ ). Fakat endometriyum kalınlığı açısından kontrol grubuna göre yüksek doz metformin (200 mg/kg) uygulanan grupta anlamlı olarak azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Endometriyumun menstrüasyon sonrası tekrar şekillenip kalınlaşması östradiolün etkisiyle gerçekleşmektedir. İlgili grupların serum östradiol seviyelerine baktığımızda benzer fark bu parametrede de ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla düşük östradiol seviyesinin ilgili grupta endometriyumun yeterince kalınlaşmasını sağlayamaması beklenen bir durumdur. Literatürde uterusun değerlendirildiği çalışmalar çoğunlukla yetişkinlerde gerçekleştirilmiş ve endometriyozis, endometriyal hiperplazi, PKOS gibi hastalıklar üzerine yapılmıştır. Bu hastalıklarda görülen değişken östrojen seviyesinin metformin ile düzenlendiği ve artmış veya azalmış endometriyum kalınlığının düzeldiği belirtilmiştir. Oner ve ark.'nın (2011), yetişkin sıçanlarda endometriyozis modeli oluşturarak yaptıkları çalışmada, metformin 4 hafta boyunca 100 ve 200 mg/kg/gün doz şeklinde verilerek endometriyum kalınlıklarını da değerlendirilmişlerdir. Çalışmamızdaki doz oranlarıyla da örtüşen bu çalışmada, endometriyum kalınlığı metformin verilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak ince bulunmuştur.

Mahamed ve ark. (2011) testosteron vererek androjenize ettikleri yavru dişi sıçanları metformin ile tedavi ettikten sonra endometriyum ve endometriyal epitel kalınlıkları bakımından değerlendirmişlerdir. Metformin grubuna 6 hafta boyunca 50



mg/kg metformin gavaj yoluyla verilmiştir. Endometriyum kalınlığı bakımından deney grubunda anlamlı bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Endometriyal ve endometriyal epitel kalınlığının değerlendirildiği başka bir çalışmada yine sıçanlar üzerinde yapılmıştır (Taş, 2012). Sıçanlar, östrodiol grubu, östrodiol + metformin grubu ve kontrol grubu olarak üçe ayrılmıştır. En kalın endometriyum ve epitel östrodiol grubunda gözlenmiştir. Östrodiol + metformin grubunda endometriyum kalınlığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak ince çıkarken, epitel kalınlıkları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu çalışmada da, bizim çalışmamızda olduğu gibi, düşük östrojen seviyesinin endometriyum kalınlığını olumsuz yönde etkilediği görülmektedir.

Metforminin endometriyal kalınlığı etkilemediği çalışmalarda ortaya konmuştur. Bayrak ve ark. (2007), PKOS'lu bayanlara 1 hafta boyunca bir kez 850 mg/gün metformin oral yolla vermişlerdir. Endometriyal kalınlık bakımından anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Palamba ve ark.'nın (2006) yaptığı çalışmada yine PKOS'lu bayanlara 6 ay boyunca 2 kez olmak üzere 850 mg/gün metformin verilmiştir. Tedavinin sonunda endometriyum kalınlıklarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Sunulan çalışmada intrauterin dönemde gebe sıçanlara farklı dozda uygulanan metforminin yavru sıçanların ovaryum ve uterusuna olan etkisi stereolojik metodlar kullanılarak değerlendirildi. Bunların yanı sıra yavru sıçanların kan örneklerinden serum östradiol seviyeleri biyokimyasal analiz ile ölçüldü ve vücut ağırlıkları değerlendirildi.
- Yavru sıçanların dış görünüşlerinde ve iç organlarında belirgin bir malformasyona rastlanmamıştır ve vücut ağırlıkları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ( $p>0,05$ ).
- Stereolojik analizler sonuçlarında göre; oosit sayısı, ovaryum, korteks, medulla hacimlerinde, primer, sekonder follikül hacimlerinde, endometriyal epitel kalınlığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ( $p>0,05$ ), tersiyer follikül hacmi ve endometriyum epitel kalınlığı bakımından Metformin 200 grubu, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).
- Östradiol seviyesi açısından ise Metformin 200 grubunda, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanırken ( $p<0,05$ ), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).
- Literatürde ortaya konulduğu gibi düşük doz metforminin gebelikte kullanımının güvenli olduğu bu çalışmada da gözlenmiştir. Ancak sunulan çalışmada yüksek doz metformin kullanımına bağlı olarak yavrularda ortaya çıkan endometriyum incelmeleri ve olgun follikül hacmindeki azalmanın etkileri değerlendirilmelidir. Bu durumun olası etkilerini ortaya koymak gerekebilir. Bunun için bu doza maruz kalan yavrulardan yeni gebe grupları içeren çalışmalara ihtiyaç duyulabilir.

## KAYNAKLAR

- Arguad D, Roth H, Wiernsperger N, Leverve XM. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1993;213(3):1341-1348.
- Ayas B, Korkmaz A, Gürgör PN. Cost-Effective and efficient approaches for applying stereological methods. *NeuroQuantology.* 2012;1:98-106.
- Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes Int.* 2004;21(3):115-117.
- Bayrak A, Terbell H, Urtwitz-Lane R, Mor E, Stanczyk FZ, Paulson J. Acute effects of metformin therapy include improvement of insulin resistance and ovarian morphology. *Fertil Steril.* 2007;87(4):870-875.
- Ben Sahra I, Marchand-Brustel LE, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1092-1099.
- Berkan D. Gebelikte kullanılan ilaçların fetal ve neonatal zararları. *Türkiye Klinikleri Temel Tıp Bilimleri.* 1990;10(3):173-177.
- Bondesson M, Hao R, Lin CY, Williams C, Gustaffsson JA. Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochim Biophys Acta.* 2014;10(4):2-6.
- Ceviz C. Diş hekimliğinde sıklıkla kullanılan ilaçların gebelik üzerine etkileri. *Ege Üniversitesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir, Bitirme Tezi.* 2008:17.
- Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cells biology: A brief survey. *J Am Physiol.* 1990;258:148-156.
- Dee Leo V, Marca A, Petraglia F. Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 2003;24:633-667.
- Diamenti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandarakis E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2010;162:193-212.

- Düzova H, Emre MH. Menstrüel siklus fizyolojisi Çelik Ö. Editör, Yardımcı Üreme Teknikleri. 1. Baskı, Adana, Adana Nobel Tıp Kitabevi. 2011;31-56.
- Elbert BL, Firdi JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem.* 1995;270:29083-29089.
- Elia E, Quintana R, Carrere C, Bazzano MV, Rey-Valzacchi G, Paz DA. Metformin decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome: an experimental study. *J Ovarian Res.* 2013;6(1):6-62.
- Elia EM, Belgorosky D, Faut M, Vighi S, Pustrovrh C, Luigi D, Mott A. The effects of metformin on uterine tissue of hyperandrogenized BALB/c mice. *Mol Hum Reprod.* 2009;7:421-432.
- Elnashar AM. The role metformin in ovulation induction: Current status. *Middle East Society Journal.* 2011;6:175-181.
- Erkekoğlu P, Giray B, Şahin G. Hamilelik ve laktasyon döneminde antiobezitik ilaç kullanımının toksikolojik açıdan değerlendirilmesi. *Hacettepe Tıp Derg.* 2008; 39:121-133.
- Eşrefoğlu M. Dişi Üreme. Özel Histoloji. 1. Baskı, Malatya, Medipres Matbaacılık. 2009;219-246.
- Falbo A, Orio F, Venturella R, Rania E, Materazzo C, Tolino A, Zullo F, Palomba S. Does metformin affect ovarian morphology in patients with polycystic ovary syndrome? A retrospective cross-sectional preliminary analysis. *J Ovarian Res.* 2009;31:2-5.
- Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1999;28:361-378.
- Geinisman Y, Gundersen HJG, Van Der Zee E, West MJ. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *J Neuro Endocrinol.* 1996;25:805-819.
- Genazzani AD, Ricchieri F, Prati A, Chierchia E, Rattighieri E, Bosco G, Despini G, Campedelli A, Farinetti A, Santagni S. PCOS and metformin: from pharmacology to clinical use for women's health. *Archives of Perinatal Medicine.* 2012;18(1):27-36.

- Goldman J, Murr AS, Cooper R. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytolog and its utility in toxicology studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007;80:84-97.
- Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Sieve-Smith L, Tracy T, Moore SK. Plasminogen activator inhibitör activity: an independet risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary sendrome. *Metabolism.* 1999; 48:1589-1595.
- Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effects. *J Microcs.* 1977;111:219-223.
- Gundersen, HJG. Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microscopica Acta.* 1978;81:107-117.
- Gundersen HJG, Østerby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well !'. *J Microsc.* 1981;121:65-73.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bentsen TF; Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: disector, fractionator and point-sampled intercepts and their use in pathological research. *APMIS.* 1998b;96:857-881.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkerbeng B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. *APMIS.* 1998a;96:379-394.
- Gundersen HJG, Jensen EBV. The efficiency of systematic sampling in stereogoly and its prediction. *J Microcs.* 1987;147:229-263.
- Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereogoly-reconsidered. *J Micros.* 1999;193:199-211.
- Gülaç E. Postmenopozaldiabetik hastalarda insülin ve metforminin endometriyal kalınlık, IGF1 ve IGF1 reseptör düzeyi üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Kayseri, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2012;4-27.
- Harmancı A, Gürlek A. Eski ilaç, eski ve yeni kullanımları: Metformin. *Dahili Tıp Bilim Derg.* 2005;12(1):29-37.

- Hawthorne G. Metformin use and diabetic pregnancy has its time come. *Diabet Med.* 2006;23:223-227.
- Helmunt E, Damm P, Molsted-Pedersen L. Oral hypoglycaemic agents in 118 diabetic pregnancies. *Diabet Med.* 2000;17:507-511.
- Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereogoly: Three dimensional measurement in microscopy.* U.K. Bios Scientific Publishers. 1998.
- Inzucchi SE. Diabetes mellitusun sınıflandırılması ve tanımı. Demiriz I, Demiriz B. Editör, *Diabetes Mellitus El Kitabı (çeviri)*, 6. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2009:1-14.
- Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S, Rodriquez-Armas O, Rivas-Santiago A, Koistinen R, Nestler JE. Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum gylcodelin and insülin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1126-1133.
- Junqueira LC, Carneiro J. Dişi üreme sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. Editör, *Temel Histoloji (çeviri)*'de, Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006;449-458.
- Kaya H, Desdicioğlu R. Polikistik over sendromu. Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç. Haberal A. Editör, *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*, 3. Baskı, Atlas Kitapçılık. 2012;1701-1735.
- Kirpicnikov D, McFarlane SI, Sower JR. Metformin: An update. *Ann Intern Med.* 2002; 137:23-33.
- Korkmaz A, Ayas B, Çiftçi N. Fiziksel disektör çiftlerinin görüntü yakalama kartı ile görüntülenmesi: Etkin ve ekonomik yeni bir stereolojik uygulama. VI. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Bildiri Özetleri. 2002.
- Kumar P, Khan K. Effects of metformin use in pregnant patients with polycstic ovary sendrome. *J Hum Repord Sci.* 2012;5(2):166-169.
- Lautatzis ME, Goulis DG, Vrontakis M. Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus of polycystic ovary syndorme: A systematic rewiew. *Metabolism.* 2013;62:1522-1534.

- Lergo RS, Zaino RJ, Demers LM, Kunselman AR, Gnatuk CL, Willams NI, Dodson WC. The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovarian endometrium in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(4):402.
- Lilja AE, Mathiesen ER. Polycystic ovary syndrome and metformin in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol.* 2006;85:861-868.
- Liu KE, Tataryn IV, Sagle M. Use of metformin for ovulation induction in women who have polycystic ovary syndrome with or without evidence of insulin resistance. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006;28(7):595-599.
- Mahamed RR, Maganhin CC, Simoes MJ, Baracat EC, Soares JM. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertil Steril.* 2011;95:1507-1509.
- Mahmood K, Naeem M, Rahimnajjad N. Metformin: The hidden chronicles of a magic drug. *Eur J Intern Med.* 2013;24:20-26.
- Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effect on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril.* 2003;79(4):956-62.
- Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras Ferras C, Menendez JA. Metformin and cancer. *Cell Cycle.* 2010;9:1057-1064.
- Mather KJ, Verna S, Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1344-1350.
- Mülazımoğlu SB, İde T, Aslan S. Ratlarda üreme. Yücel O. Editör, Küçük Deney Hayvanlarında Rat. 1. Baskı, Ankara. 2012;39-44.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ. Decrease in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1996;335:617-625.
- Nicholson W, Bolen S, Witkop CT, Neale D, Wilson L, Bass E. Benefit and risks of oral diabetes agents compared with insulin in women with gestational diabetes: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2009;113(1):193-205
- Oner G, Ozcelik B, Ozgun MT, Serin IS, Ozturk F, Basbug M. The effects of metformin and letrozole on endometriosis and comparison of the treatment agents in a rat model. *Hum Reprod.* 2010;25:932-937.

- Oner G, Ozçelik B, Ozgun MT, Ozturk F. The effects of metformin and letrozole on endometrium and ovary in a rat model. *Gynecol Endocrinol*. 2011;27(12):1084-1086.
- Özsan M. Polikistik over sendromlu hastalarda metformin ve roziglitazonun tek başlarına ve birlikte kullanımlarının androjenleri insülin direnci ve endotel difonksiyonu üzerinde etkileri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2011;18.
- Pakkenberg B, Gundersen HJG. Total numbers of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. *J Microsc*. 1988;150:1-20.
- Palamba S, Russo T; Orijo F, Falbo A, Manguso F, Cassella T, Tolino A, Carmina E, Colao A, Zullo F. Uterine effects of metformin administration in anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2006;21(2):467-465.
- Rena G, Person ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*. 2013;56:1898-1906.
- Rice S, Elia A, Jawad Z, Pellatt L, Masson HD. Metformin inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action in human granulosa cells: Relevance to Polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrin Metab*. 2013;98(9):1491-1500.
- Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA, Mason HD. Metformin inhibits aromatase in via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology*. 2009;150:4749-4801.
- Ross HM, Pawline W. *Histology: A Text and Atlas 6. Ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2011;831:853.
- Rowan JA, Hauge WH, Gao W, Battin MR, Moore MP. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358:2003-15.
- Sabatani ME, Guo L, Lynch M, Doyle JO, Lee H, Rudea B, Styer AK. Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation. *J Ovarian Res*. 2011;4(8):1-9.



- Sanoee FM, Neghab N, Rabiee S, Amin I. Metformin therapy decreases hyperandrogenism and ovarian volume in women with polycystic ovary syndrome. *J Med Sci.* 2011;36(2):91-94.
- Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 1996;30:359-371
- Simmons D. Metformin treatment for Type 2 diabetes in pregnancy? *Best Practice & Researc Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010;24:625-634.
- Stadtmauer LA, Toma SK, Riehl RM, Talbert LM. Metformin treatment of patitents with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization improves outcomes and is associated with modulation of the insulim-like growth factors. *Fertil Steril.* 2002;73(3):505-509.
- Sterio DC. The unbiased esmation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microcs.* 1984;29:233-249.
- Sözen EO. Menstrüel döngüde sıçan uterus epitelinde sıkı ve oluklu bağlantı proteinlerinin dağılımlarının immunohistokimyasal olarak belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Doktora Tezi, 2008;14-16.
- Takamura Y, Osuga Y, Yoshino O, Hasegawa A, Hirata T, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Koga K, Tajimata T, Yano T, Taketani Y. Metformin suppresses Interleukin (IL)- 1- Induced IL-8 production, aromatase activation and proliferation of endiometriotic stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006;92(8):3213-3218.
- Taş M. Endometrial hiperplazi oluşturulan ratlarda letrazol. Metformin ve progesteron etkilerinin karşılaştırılması. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, , Kayseri, Tıpta Uzmanlık Tezi. 2012;36-38.
- Timmins P, Donahue S, Mekker J, Marathe P. Steady-state pharmacokinetics of a novel extended relase metformin formulation. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44:721-729.
- Türköz Y, Çelik N. Erkek ve dişi cinsiyet hormonları. Çelik Ö. Editör, Yardımcı Üreme Teknikleri. 1. Baskı, Adana, Adana Nobel Tıp Kitabevi. 2011;83-100.

- Uçbek A. Metforminin nöronal hücre kültüründe profilerasyon ve apoptozis üzerine etkisi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bolu, Yüksek Lisans Tezi. 2012;6.
- Ünlü C, Berker B. Adet siklusu. Çolgar U. Editör, Reprodüktif Dönemde Endokrinoloji ve İnfertilite. 1. Baskı , İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 2008;9-19.
- Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE, Metformin increases the ovary rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil Steril*. 2001;75:310-315.
- Viollet B, Guigass B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci*. 2012;122:253-270.
- West JM. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci*. 1999;22(2):51-61.
- Westwood FR. The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staining. *Toxicol Pathol*. 2008;36:375-384.
- Witters LA. The blooming of the french lilac. *J Clin Invest*. 2001;108:1105-1107.
- Yılmaz DÖ. Deneysel sıçan endometriyozis modelinde implantasyon kusurunun histolojik olarak değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Uzmanlık Tezi. 2008;63-67.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Doebber T, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moler DE. Role of AMP-activated protein kinase in the mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108:1167-1174.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Seda KIRMZIKAN

**Doğum Yeri:** Üsküdar

**Doğum Tarihi:** 16.08.1987

**Medeni Hali:** Bekar

**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):**

**2007-2011:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

**2011-2015:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı.

**Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:**

**E-posta:** s.krmzkn@gmail.com



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
SAMSUN

Sayı : B.30.2.ODM.0.20.09.00-050.04 -30  
Konu : Araştırma Projeniz hk.

27/03/2012

Yrd. Doç. Dr. Bülent AYAS  
OMÜ Tıp Fakültesi Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı

2012/23 numaralı “İNTRAUTERİN DÖNEMDE METFORMİN UYGULAMASININ YAVRU DİŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE UTERUSUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ” konu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 26.03.2012 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ferișat KOLBAKIR  
HADYEK Başkan

Alınan kararlar Kurul kararıdır. Kararla ilgili Kurul üyelerinin aranması etik değildir. İtirazlarınızı yazılı olarak Etik Kurul sekreterliğine başvurmanız gerekmektedir.