



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
VHE-DR-2014-0001**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN DIŞI RATLARIN
GENİTAL SİSTEMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER VE BU
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE LİKOPENİN ETKİLERİ**

Mustafa YILDIZ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI**

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Mustafa YILDIZ tarafından hazırlanan ‘Deneysel diyabet oluşturulan dişi ratların genital sistemindeki değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine likopenin etkileri’ başlıklı tez, 15.05.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi:

İmzası:

Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI (Başkan)

Adnan Menderes Üniversitesi



Prof. Dr. Ülker EREN

Adnan Menderes Üniversitesi



Prof. Dr. Emrah SUR

Selçuk Üniversitesi



Prof. Dr. Funda KIRAL

Adnan Menderes Üniversitesi



Doç Dr. Levent KARAGENÇ

Adnan Menderes Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Diyabet hastalığı, genellikle kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan ve kan glikoz seviyesinin aşırı derecede yükselmesiyle sonuçlanan metabolik bir hastalıktır. Ayrıca sadece kan şekeri yüksekliği ile seyretmeyip, özel komplikasyonlara da yol açmaktadır. Günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı, diyabet tüm dünyada hızla yayılmakta ve yüksek mortalite ile morbidite riski taşımaktadır. Ülkemizde yaklaşık 2 milyon şeker hastasının ve 1,5-2 milyon kadar da gizli şeker hastasının olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığın vücutta çeşitli organların fonksiyonlarını olumsuz etkilemesinin yanında, yol açtığı sosyal ve ekonomik sorunlar nedeni ile modern toplumun sosyal bir problemi haline gelmiştir.

Günümüzde diyabet ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmakta ve sürdürülen bu çalışmaların hedefi; diyabeti önlemek, erken tanılamak, komplikasyonlarını gidermek ya da geciktirmektir. Diyabetin ve komplikasyonlarının patogeneğinde pek çok mekanizma ileri sürülmekle birlikte; bunların içinde en fazla kabul göreni artan serbest radikallerin komplikasyonlara neden olmasıdır. Yapılan çalışmalarda; diyabet hastalarının oksidatif strese duyarlı oldukları, yüksek kan glikoz düzeyinin ise; serbest radikallerin aracılık ettiği lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca diyabet tablosunda antioksidan enzim aktivitelerinin de daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Karotenoid ailesinin bir üyesi olan likopen insan vücudunda en yaygın bulunan antioksidanlardan biridir. Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin temizlenmesinde oldukça etkilidir. Çeşitli çalışmalarda likopenin oksidatif stres ve diyabet üzerine olan etkileri incelenerek yüksek kan glikoz seviyesini düşürdüğü, lipid peroksidasyonunu azaltma ve antioksidan kabiliyeti arttırmada etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca diyabetle ilişkili komplikasyonların baskılanmasında rol aldığı da ifade edilmiştir.

Sunulan çalışmada, diyabet oluşturulan erişkin dişi ratların genital organlarında meydana gelen değişiklikler belirlenmiş ve oral olarak verilen likopenin bu organlarda oluşan bozuklukların giderilmesine yönelik etkileri tespit edilmiştir. Söz konusu araştırma ‘Deneyssel diyabet oluşturulan dişi ratların genital sistemindeki değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine likopenin etkileri’ isimli ve VHF-12018 kodlu proje ile Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
EKLER	xviii
GİRİŞ	1
1.1. Dişi Genital Sistem	1
1.1.1. Ovaryum	1
1.1.1.1. Ovaryum folikülleri	2
1.1.1.1.1. Primordial folikül	2
1.1.1.1.2. Primer folikül	3
1.1.1.1.3. Sekonder folikül	3
1.1.1.1.4. Tersiyer folikül	4
1.1.1.1.5. Graaf folikülü	4
1.1.1.1.6. Atretik folikül	5
1.1.1.2. Ovulasyon	5
1.1.1.3. Korpus luteum	6
1.1.1.4. Östrus siklusu	7
1.1.1.4.1. Proöstrus	8
1.1.1.4.2. Östrus	8
1.1.1.4.3. Metöstrus	8
1.1.1.4.4. Diöstrus	8
1.1.1.4.5. Anöstrus	9

1.1.2. Tuba Uterina	9
1.1.3. Uterus	10
1.1.3.1. Endometriyal siklus	12
1.1.3.1.1. Proliferasyon evresi	12
1.1.3.1.2. Sekresyon evresi	13
1.1.3.1.3. İskemi evresi	13
1.1.3.1.4. Menstruasyon evresi	13
1.1.3.2. Serviks uteri	13
1.1.4. Vajina	14
1.1.5. Vulva (Dış Genital Organlar)	15
1.1.5.1. Vestibulum vajina	15
1.1.5.2. Labiyumlar	15
1.1.5.3. Klitoris	16
1.2. Dış Genital Sistemin Gelişimi	16
1.2.1. Farklılaşmamış Gonad	16
1.2.2. Primordial Cinsiyet Hücreleri	17
1.2.3. Ovaryumların Gelişimi	17
1.2.4. Dış Genital Kanalların ve Bezlerin Gelişimi	18
1.2.5. Dış Dış Genital Organların Gelişimi	18
1.3. Diabetes Mellitus	19
1.3.1. Diyabetin Sınıflandırılması	19
1.3.1.1. Tip 1 diabetes mellitus	19
1.3.1.2. Tip 2 diabetes mellitus	20
1.3.2. Diyabet Tanısı	21
1.3.3. Diyabet Komplikasyonları	22
1.3.3.1. Diyabetin akut komplikasyonları	22
1.3.3.1.1. Hipoglisemi	22
1.3.3.1.2. Diyabetik ketoasidoz	22

1.3.3.1.3. Hiperozmolar ketonik olmayan sendrom	23
1.3.3.1.4. Laktik asidoz	23
1.3.3.1.5. Bakteriyel/fungal (mantar) enfeksiyonlar	23
1.3.3.2. Diyabetin kronik komplikasyonları	24
1.3.3.2.1. Makroangiopatiler	24
1.3.3.2.1.1. Makrovasküler hastalık	24
1.3.3.2.2. Mikroangiopatiler	24
1.3.3.2.2.1. Retinopati	24
1.3.3.2.2.2. Nefropati	25
1.3.3.2.2.3. Nöropati	25
1.3.4. Diyabet Tedavisi	26
1.3.5. Deneysel Diyabet Modelleri	27
1.3.6. Diabetes Mellitus ve Dişi Genital Sistem.....	27
1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	30
1.4.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	32
1.4.1.1. Süperoksit radikali.....	32
1.4.1.2. Hidrojen peroksit radikali	32
1.4.1.3. Hidroksil radikali	33
1.4.1.4. Singlet oksijen.....	34
1.4.1.5. Hipokloröz asit	34
1.4.2. Reaktif Nitrojen Türleri.....	35
1.4.2.1. Nitrik oksit (NO)	35
1.4.3. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi	36
1.4.4. Antioksidan Sistemler	37
1.4.4.1. Enzimatik antioksidanlar	38
1.4.4.1.1. Süperoksit dismutaz.....	38

1.4.4.1.2. Glutasyon peroksidaz	38
1.4.4.1.3. Katalaz	39
1.4.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	39
1.4.4.2.1. C vitamini.....	39
1.4.4.2.2. E vitamini	40
1.4.4.2.3. Karotenoidler	41
1.4.4.2.3.1. Likopen	41
1.5. Diyabette Oksidatif Değişiklikler	44
1.6. Konneksinler.....	45
1.7. Apoptozis.....	48
2. GEREÇ VE YÖNTEM	52
2.1. Gereç	52
2.2. Yöntem.....	53
2.2.1. Histolojik Yöntem.....	53
2.2.1.1. Üçlü boyama metodunun uygulanması	53
2.2.1.2. Histolojik ve histometrik değişimlerin belirlenmesi	54
2.2.2. Histokimyasal Yöntemler	55
2.2.2.1. Periyodik asit schiff boyama metodu	56
2.2.2.2. Alcian blue pH: 2,5 boyama metodu	56
2.2.2.3. TUNEL yöntemi.....	57
2.2.2.4. Histokimyasal değişimlerin belirlenmesi	58
2.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem	59
2.2.3.1. Konneksin-43 yoğunluğunun değerlendirilmesi	60
2.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü	60
2.2.4.1. Ovaryum dokularından homojenat hazırlanması	61
2.2.4.2. Ovaryum dokusunda Lowry metodu ile protein miktarı tayini.....	61
2.2.4.3. Ovaryum dokusunda malondialdehid düzeyinin belirlenmesi.....	63
2.2.4.3.1. Malondialdehid düzeyinin değerlendirilmesi.....	64
2.2.5. İstatistiksel Analiz.....	65

3. BULGULAR.....	66
3.1. Vücut Ağırlığı.....	66
3.2. Açlık Kan Glikoz Düzeyi	66
3.3. Östrus Siklusunun Takibi	67
3.4. Ovaryum	67
3.4.1. Histolojik Bulgular	67
3.4.2. Histometrik Bulgular	72
3.4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	74
3.4.4. Histokimyasal Bulgular	78
3.4.4.1. Apoptotik hücre yoğunluğu	78
3.4.5. Malondialdehid Düzeyi	80
3.5. Uterus	81
3.5.1. Histolojik Bulgular	81
3.5.2. Histometrik Bulgular	82
3.5.3. Histokimyasal Bulgular	85
3.5.3.1. PAS reaksiyonu	85
3.5.3.2. Alcian Blue pH: 2,5 reaksiyonu	86
3.6. Vajina	87
3.6.1. Histolojik Bulgular	87
3.6.2. Histometrik Bulgular	89
3.6.3. Histokimyasal Bulgular	91
3.6.3.1. PAS reaksiyonu	91
4. TARTIŞMA.....	93
4.1. Vücut Ağırlıkları.....	93
4.2. Açlık Kan Glikoz Düzeyi	95
4.3. Östrus Siklusunun Değerlendirilmesi.....	96

4.4. Ovaryum	97
4.4.1. Histolojik Değerlendirmeler	97
4.4.2. Histometrik Değerlendirmeler	99
4.4.3. Konneksin-43 Yoğunluğunun Değerlendirilmesi	99
4.4.4. Apoptotik Hücre Yoğunluğunun Değerlendirilmesi	101
4.4.5. Malondialdehid Düzeyinin Değerlendirilmesi	101
4.5. Uterus	102
4.5.1. Histolojik Değerlendirmeler	102
4.5.2. Histometrik Değerlendirmeler	103
4.5.3. Histokimyasal Değerlendirmeler	103
4.5.3.1. PAS reaksiyonunun değerlendirilmesi	103
4.5.3.2. Alcian blue pH: 2,5 reaksiyonunun değerlendirilmesi	105
4.6. Vajina	105
4.6.1. Histolojik Değerlendirmeler	105
4.6.2. Histometrik Değerlendirmeler	106
4.6.3. PAS Reaksiyonunun Değerlendirilmesi	107
5. SONUÇ	108
ÖZET	110
SUMMARY	112
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	144
TEŞEKKÜR	145

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

·OH	Hidroksil Radikali
¹ O ₂	Singlet Oksijen
8-OHdG	8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin
AB	Alsian Mavisi
Abs	Absorbans
ALP	Alkalen Fosfataz
ANOVA	Varyans Analizi
ATP	Adenozin Trifosfat
ATPase	Adenozin Trifosfataz
BA	Büyük Antral
Bcl-2	B-Hücreli Lenfoma-2
BSA	Sığır Serum Albümini
C ₆ H ₈ O ₆	Askorbik Asit
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CRP	C-Reaktif Protein
Cu	Bakır
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat
Cx40	Konneksin-40
Cx43	Konneksin-43
Cx45	Konneksin-45
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E	Endometriyum

ELISA	Enzim Bağlantılı İmmün Analiz
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FasL	Fas Ligand
Fe	Demir
FSH	Folikülü Stimüle Eden Hormon
GJA1	Gap Junction Alfa-1 Protein
GLH	Ganüloza Luteal Hücreler
GnRH	Gonadotropin Serbestleyici Hormon
GPx-1	Glutasyon Peroksidaz-1
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
H	Hidrojen
H/R	Hipoksi/Reoksijenasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HbA1c	Glikolize Hemoglobin
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropini
HRP	Horseradiş Peroksidaz
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I
IVGTT	İntravevöz Glikoz Tolerans Testi
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K	Potasyum
K	Korteks
KA	Küçük Antral
KILLER	TRAIL Ölüm Reseptörü
KL	Korpus Luteum
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	Sodyum Potasyum Tartarat

L	Lumen
LP	Lamina Propriya
LH	Luteinizasyon Hormonu
LTH	Luteotropik Hormon
M	Medulla
M	Miyometriyum
MDA	Malondialdehid
Mg/dl	Miligram/Desilitre
Mn	Mangan
Mo	Molibden
mRNA	Mesajcı RNA
Na	Sodyum
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NANC	Adrenerjik Olmayan, Kolinergik Olmayan
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Doğal Öldürücü
Nm	Nanometre
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NO ₂ ⁺	Azot Dioksit
NO ₂ ⁺	Nitronyum İyonu
NOD	Obez Olmayan Diyabetik
O	Oksijen
O ₂ ⁻	Serbest Süperoksit Radikal Anyonu
OGTT	Oral Glikoz Tolerans Testi

OH	Hidroksit
Ort.±S.H.	Ortalama±Standart Hata
ÖD	Önemli Değil
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PCO	Protein Karbonil
Pmol/mg	Pikomol/Miligram
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOD1/CuZn-SOD	Süperoksit Dismutaz-1/Enzim Bakır, Çinko Süperoksit Dismutaz
SOD2/Mn-SOD	Süperoksit Dismutaz-2/Manganez Süperoksit Dismutaz
SOD3/EC-SOD	Süperoksit Dismutaz-3/Enzim Ekstraselüler Süperoksit Dismutaz
STZ	Streptozotosin
TA	Tunika Adventisya
TAS	Toplam Antioksidan
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Madde
TBS	Tuzlu Tris Tamponu
TCDD	2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-Dioksin
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TGF-β1	Transforming Büyüme Faktörü β1
TLH	Teka Luteal Hücre

TM	Tunika Mukoza
TMs	Tunika Muskularis
TOS	Toplam Oksidan
TRAIL	TNF İlişkili Apopitozis İndükleyen Ligand
T-SH	Toplam Tiyo
TUNEL	Terminal Deoksintükleotidil Transferaz-Aracılı dUTP İşaretleme

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Folikül sınıflandırması	55
Çizelge 2.2. BSA standart eğrisi	63
Çizelge 3.1. Kontrol ve diyabet gruplarında vücut ağırlığı değerleri	66
Çizelge 3.2. Kontrol ve diyabet gruplarında açlık kan glikoz değerleri	67
Çizelge 3.3. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda histopatolojik yapıların yoğunluk değerleri	70
Çizelge 3.4. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda folikül ve korpus luteum sayıları	72
Çizelge 3.5. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda folikül ve korpus luteum çapları	73
Çizelge 3.6. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda konneksin-43 boyanma yoğunluğu değerleri	75
Çizelge 3.7. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda apoptotik hücre sayıları	79
Çizelge 3.8. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda malondialdehid değerleri	81
Çizelge 3.9. Kontrol ve diyabet gruplarında uterus bez sayısı ve histometrik ölçüm değerleri	83
Çizelge 3.10. Kontrol ve diyabet gruplarında uterus yüzey ve bez epitellerinde PAS pozitif boyanma yoğunluğu değerleri ile endometriyal bağ dokuda birim alanda PAS pozitif hücre sayıları	85
Çizelge 3.11. Kontrol ve diyabet gruplarında uterus AB pH: 2,5 pozitif boyanma yoğunluğu değerleri	87
Çizelge 3.12. Kontrol ve diyabet gruplarında vajinada histometrik ölçüm değerleri	89
Çizelge 3.13. Kontrol ve diyabet gruplarında vajina lamina epiteliyalisinde	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Likopen'in yapısı	42
Şekil 3.1. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait ovaryumda korteks ve medulla katmanları	68
Şekil 3.2. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait ovaryumun genel görünümü	69
Şekil 3.3. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait ovaryum dokusundaki korpus luteum görüntüsü	69
Şekil 3.4. Ovaryum dokusundaki histopatolojik değişimler	71
Şekil 3.5. Kontrol+mısır yağı ve diyabet+mısır yağı gruplarında ovaryumda korpus luteum çapları	73
Şekil 3.6. Ovaryumda sekonder ve büyük antral foliküllerde konnesin-43 ekspresyonu	76
Şekil 3.7. Ovaryumda primordial ve atretik foliküllerde konnesin-43 ekspresyonu	77
Şekil 3.8. Ovaryumda intersitisyel hücreler ve korpus luteumdaki luteal hücrelerde konnesin-43 ekspresyonu	78
Şekil 3.9. Ovaryumda büyük antral folikül ve korpus luteumda apoptotik hücreler	80
Şekil 3.10. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait uterusun genel görünümü	82
Şekil 3.11. Kontrol ve diyabet gruplarında endometriyum kesitleri	84
Şekil 3.12. Kontrol+likopen ve diyabet+likopen gruplarına ait uterus bez epitellerinde PAS pozitif aktivite	86
Şekil 3.13. Kontrol+likopen ve diyabet+likopen gruplarına ait uterus bez epitellerinde AB pH: 2,5 pozitif aktivite	87
Şekil 3.14. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvanda vajinanın genel görünümü	88

Şekil 3.15. Kontrol+mısır yağı ve diyabet+mısır yağı gruplarında vajina lamina epiteliyalisi	89
Şekil 3.16. Kontrol ve diyabet gruplarında vajina kesitleri	90
Şekil 3.17. Kontrol+likopen ve diyabet+mısır yağı gruplarında vajinada PAS reaksiyonu	92

EKLER

Çizelge 1. Uluslararası temel ölçü birimleri

Birim	Sembol
Sıcaklık	°C
Dakika	'
Gram	g
Kilogram	kg
Litre	L
Mikrogram	µg
Mikrometre	µm
Saniye	''

1.GİRİŞ

1.1. Dişi Genital Sistem

Dişi genital sistem; eşey hücrelerini üreten ovaryumlar, tuba uterinalar, uterus, vajina ve dış genital organ olarak da vulva'dan oluşmaktadır (Tanyolaç 1999). Dişi üreme sistemi organlarının hepsi birçok önemli görevleri yerine getirirler. Bunlar; dişi cinsiyet hormonlarının salgılanması (östrojen, progesteron), oosit gelişimi ve fertilizasyon için uygun ortamın sağlanması, blastositlerin taşınması ve implantasyonu, gebelik boyunca fetüsün gelişimi (Eroschenko 2001), doğumdan sonra yavrunun üreme organlarının büyümesinin düzenlenmesi ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi olarak özetlenebilir (Abraham 2006).

1.1.1. Ovaryum

Ovaryum, eşey hücrelerini meydana getiren, salgıladığı hormonlarla dişi genital sistemin diğer organları üzerinde de etkili olan ve genital siklusu düzenleyen hem ekzokrin hemde endokrin bir organdır (Tanyolaç 1999, Paker 1993). Ekzokrin işlevi, puberte döneminden başlayarak menapoza kadar süren ve 28 günlük sikluslarla, bir dişi yumurta hücresinin üretilip holokrin tip salgılamayla atılmasıdır. Endokrin işlevi ise, steroid yapıda hormonlar olan östrojen ve progesteron salgılamasıdır (Karaöz 2002). Ovaryum genellikle oval olup hilus bölgesinden mezovaryum ile asılıdır. Mezovaryumu, peritonun visseral yaprağı (mezotel ve bağdoku) örter. Ovaryumun geri kalan kısmı germinatif epitel ile kaplıdır. Germinatif epitel bir bazal membran üzerine oturur. Tek katlı prizmatik ya da kübiktir. Altında sıkı bağdokulu tunika albuginea bulunur (Tanyolaç 1999). Germinatif epitel teriminin kullanılması, embriyonel dönemde çoğalarak seks kordonlarını oluşturmasından ileri gelir (Erdost 2010). Tunika albuginea'nın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu dış kısım kortikal bölge yer alır. Foliküller kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblastlar içerir ve bu fibroblastlar hüморal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir (Junqueira ve ark 2006). Bunlar ovaryum paranşimindeki bağdoku içinde yaygın olarak görülen epiteloïd karakterde intersitisyel hücrelere dönüşerek östrojen hormonu salgılarlar (Tanyolaç 1999). Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medullar bölgedir (Junqueira ve ark 2006). Kan damarlarının bol ve yaygın oluşu nedeniyle medullaya zona vaskuloza da

denir. Ayrıca bu bölgede düz kas telleri, lenf damarları ve sinir telleri bulunur (Tanyolaç 1999). Korteks ve medulla bölgeleri arasında belirgin bir sınır yoktur (Junqueira ve ark 2006). Korteks ve medullanın yapısı seksüel siklusun evrelerine, yaşa ve türe göre oldukça değişkendir (Erdost 2010). Kanatlılarda ise sadece sol ovaryum aktif olup sağ ovaryum rudimenterdir (Ergün ve ark 2012). Ovaryumun dış yüzeyi ovulasyon gerçekleşmediği için puberte dönemine kadar düzdür; ovulasyon başladıktan sonra yüzey düzgünlüğünü kaybeder (Erdost 2010).

1.1.1.1. Ovaryum folikülleri

Ovaryum folikülleri korteksin stroması içinde yer alır. Bir folikül, bir ya da daha fazla tabaka oluşturmuş folikül hücreleriyle (granüloza hücreleri) çevrili bir oositin meydana gelir (Junqueira ve ark 1998). Doğumda insan ovaryumun tahmini folikül sayısı dört yüz bin kadardır. Bu foliküllerin yaklaşık 400-450 tanesi olgunlaşmasını tamamlar ve ovum olarak üreme yollarında serbest bırakılır. Foliküllerin çoğu atreziye uğrar, menopozdan sonra ise hemen hemen hiç folikül kalmaz (Zhang 1999). Foliküllerin boyutu ve epitel kılıfın kalınlığı gelişim aşamalarına göre değişiklik gösterir. Folikül büyümesi esnasında; foliküller bir dizi değişiklikler geçirerek, primordial, primer, sekonder ve olgunlaşmış foliküller olarak ayırt edilebilirler (Krause 1996).

1.1.1.1.1. Primordial folikül

Tek katlı yassı epitelli foliküllerdir (Ergün ve ark 2012). Ovaryumda primordial foliküllerin en çok sayıda bulunduğu dönem doğum öncesidir (Junqueira ve ark 1998). Doğumdan sonra ise sayıları azalır (Gartner ve Hiatt 1997). Primordial foliküller ilk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında ovaryumlarda ortaya çıkar. Primordial foliküllerin erken dönem gelişimleri gonadotropin uyarımından bağımsızdır (Ross ve ark 2003). Kortekste germinatif epitelin altında yer alırlar (Karaöz 2002). Her bir primordial folikül bir primer oositin oluşur (Junqueira ve ark 1998). Primordial folikül içindeki oosit yaklaşık 25 µm çapında, küre biçiminde bir hücredir. Büyük bir nükleusu ve yine büyük bir nükleolusu vardır. Kromozomlar çoğunlukla çözölmüş haldedir ve koyu boyanmazlar. Sitoplazmadaki organeller nükleusa yakın bir küme oluşturma eğilimi gösterirler. Sitoplazmada çok sayıda mitokondri birkaç golgi kompleksi ve endoplazmik retikulumu sarnıçları bulunur (Junqueira ve ark 2006). Primordial foliküldeki yumurta hücresi primer oosit ergenlik dönemine kadar 1. olgunlaşma bölünmesinin profaz evresinde bekler (Ergün ve ark 2012).

1.1.1.1.2. Primer folikül

Yaşam boyunca ovaryum yüzeyine yakın bulunurlar (Tanyolaç 1999). Puberte döneminde salgılanmaya başlayan folikül stimulan hormonun (FSH) etkisiyle hem oosit hemde folikül epitel hücreleri gelişir (Ergün ve ark 2012). Başlangıçta tek katlı kübik olan folikül epitel hücreleri daha sonra tek katlı prizmatik folikül epitel hücrelerine dönüşür. Primer oosit I. mayoz bölünmenin profaz aşamasındadır (Erdost 2010).

1.1.1.1.3. Sekonder folikül

Ovaryumun yüzeyinden daha derinde yer alırlar. Çoğalan folikül epitel hücreleri gittikçe büyüyen oositi çok sıralı olarak sararlar. Sayıları artan sitoplazmadan fakir folikül epitelleri, özellikle çekirdekleri ile taneli bir görüntü sergilerler; bu yüzden bu hücrelere granüloza hücreleri de denir. Oosit ile folikül epitel hücreleri arasında homojen şekilde bir kalınlaşma dikkati çeker. Oosit ve folikül epitellerinin oluşturduğu bu yapıya membrana pellusida ya da zona pellusida adı verilir (Tanyolaç 1999). Elektron mikroskobunda hem oosit, hemde en iç sıradaki folikül epitel hücrelerinde bol mikrovillusun bulunduğu, aralarında glikoprotein ara maddenin yer aldığı görülür. Bu yapı büyüyen oositin folikül epitelinden difüzyonla beslenmesini karşılamak için yüzeyi genişletir (Paker 1993). Folikül epitellerini saran bazal membranın dışında bağdoku iplikleri (kollagen ve retikulum iplikleri) ve bağdoku hücreleri (fibroblastlar) özel bir kılıf şekillendirir; buna da teka folikülü denir (Tanyolaç 1999). Bu yapı bir süre sonra teka interna ve eksterna olarak ikiye ayrılır. Teka interna hücreleri farklılaşmalarını tamamladıklarında steroid sentezleyen hücrelerin yapısal özelliklerini kazanırlar. Bu hücrelerin testesteron salgıladığı ve bu salgının daha sonra granüloza hücreleri tarafından östrojene dönüştürüldüğü kabul edilmektedir (Karaöz 2002). Teka internadaki hücreler bol miktarda agranüler endoplazmik retikulum, tübüler kristaya sahip mitokondriyumlar ve çok sayıda lipid damlacığı içerir. Hücreler arasında kan ve lenf kapillar ağı vardır. Bu özellik sadece teka internada mevcut olup granüloza hücrelerinde yoktur (Erdost 2010). Teka eksternada bağ doku hücreleri ile kılcal damarlar bulunur ve damarlarla salgı hücreleri arasında kapiller pleksus vardır (Karaöz 2002).

1.1.1.1.4. Tersiyer folikül

Folikül epitelleri (granüloza hücreleri) arasındaki gevşek yapıdan kaynaklanan düzensiz interselüler aralıklar, hücre sıraları artarak folikül büyüdükçe yer yer boşluklar şeklinde belirmeye başlar. Başlangıçta küçük ve çok sayıda olan bu boşluklar (antrum folikülü) birbiriyle birleşerek daha az sayıda fakat daha geniş boşluklar halini alır. Bu boşlukların içi bir sıvı ile doludur. Bu sıvı folikül epitellerinden salgılanan bol miktarda steroid hormonları (östrojen, progesteron, androjen), hiyaluronik asit ve proteolitik enzimleri içerir. Yine bu aşamada teka folikülünden ve intersitisyel hücrelerden de östrojen salgılanır (Tanyolaç 1999).

1.1.1.1.5. Graaf folikülü

Folikül büyümesi ovaryum yüzeyine doğru olur. İçi sıvıyla dolu olan antrum tek bir boşluk halini alır ve folikül de çok büyür. Bu durumda tersiyer folikül ovaryum yüzeyine dayanır ve burada germinatif epitel ile onun altındaki çok incelmış tunika albugineya'yı dışa doğru kubbelendirir. Bunlar çok gelişmiş ve patlamaya yakın aşamadaki foliküllerdir (Tanyolaç 1999). Graaf folikülünde oosit I mayoz bölünmenin ikinci aşamasına geçerek oosit II'yi oluşturur (Ergün ve ark 2012). Oositin hemen çevresindeki yüksek prizmatik folikül epitelleri oositi taç gibi sarar. Bu epitellerin oluşturduğu katmana korona radyata denir. Oosit ile korona radyata arasında zona pellusida (membrana pellusida) vardır. Bu katmanın ince yapısında, oosit ile korona radyata hücrelerinin sitoplazma uzantılarının (mikrovillusların) 'gap junction' şeklindeki bağlantıları görülür. Korona radyatanın dışında birkaç sırada düzensiz dizilişte folikül epitelleri bulunur. Bu oluşumların tümü folikül duvarının bir tarafına tutunmuş olarak adeta bir yarımada biçiminde antruma doğru uzanır. Bu uzantıya kumulus ooforus adı verilir. Folikül duvarını oluşturan birkaç katlı epitel hücrelerinin en dışındakiler bazal membran ile sarılırlar, içtekiler ise antrumu sınırlandırır. Bazal membrandan antruma kadar folikül duvarını oluşturan ve antrumu çevreleyen bu folikül epitelleri katmanına stratum granulozum denir (Fawcett 1993, Tanyolaç 1999).

Sekonder folikülde de var olan teka folikülü tersiyer folikülde çok daha belirgindir. Teka internanın hücreleri tamamen farklılaştığında steroid üreten hücrelerle benzerlik gösterir. Bu hücrelerin granüloza tabakasına taşınan bir steroid hormon olan androstenedion sentezlediği bilinmektedir. Granülozadaki hücreler folikül uyarıcı

hormonun etkisiyle androstenedion'u östrojene dönüştüren aromataz enzimini salgılar. Östrojen folikülü çevreleyen stromaya döner, kan damarları aracılığıyla kana geçer ve tüm vücuda yayılır (Junqueira ve ark 2006).

1.1.1.1.6. Atretik folikül

Ovaryumda doğuştan var olan oositlerin pek çoğu olgunlaşarak ovaryumdan atılma aşamasına ulaşamaz. Her gelişme evresinden çeşitli büyüklükte foliküllerde ve çoğunlukla da primer foliküllerde büyümenin durması ve folikülün gerilemesi söz konusudur (Tanyolaç 1999). Folikül hücreleri ile oositler ölür ve ortadan kaldıran (fagositoz) hücreler tarafından sindirilir. Bu süreç granüloza hücrelerinde mitoz bölünmenin durması, granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması ve oositin ölümü ile belirginleşir. Hücre ölümünden sonra kalıntıları fagosit etmek üzere folikülü makrofajlar istila eder. Daha ileri evrede, fibroblastlar folikülün bulunduğu alanı kaplar ve kollajen içeren bir nedbe oluşturur (Junqueira ve ark 2006); buna da atretik folikül denir. Gerileme sürecine giren folikül ne kadar gelişmişse, yerinde şekillenen nedbe dokusu da o kadar büyük olur. Folikül atrezisinde serbest kalan hormon da seksüel siklusun düzenlenmesine katkıda bulunur (Tanyolaç 1999). Atretik foliküller camsı membran denilen kalın ve kıvrılmış membranöz materyal, çok değişikliğe uğramamış zona pellisuda, dejenere olmuş oosit, folikül hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile ayırt edilirler (Abraham 2006).

Folikül atrezisi doğum öncesinden menapozun birkaç yıl sonrasına kadar görülmesine rağmen, özellikle yoğun olduğu bazı dönemler vardır. Anne hormonlarının etkisinin ortadan kalktığı doğumdan hemen sonraki dönem ile hormonal değişikliklerin görüldüğü ergenlik ve gebelik sırasında oldukça belirginleşir (Junqueira ve ark 2006). Ayrıca postmenopozal dönem kadınlarda primordial foliküller yoktur. Ovaryum korteksi sadece stroma ve korpus albicansları içerir, gelişmekte olan foliküller ise bulunmaz. Postmenopozal dönemde ovaryum premenopozal dönemden daha küçüktür ve atrofik olarak tanımlanır (Young ve Heat 2000).

1.1.1.2. Ovulasyon

Germinatif epitele iyice yaslanarak ovaryum korteksini dışarıya doğru balonlaştıran Graaf folikülü tunika albuginea'daki damarları da sıkıştırır ve o bölgenin sağlıklı beslenmesine engel olur. Bu arada folikül epitel hücrelerinin salgıladığı proteolitik

enzimler de kolaylıkla teka'yı, tunika albuginea'nın bağdokusunu ve germinatif epitelini eritir. Aynı anda kanda östrojen düzeyinin en yüksek noktaya ulaşması, hipofiz ön lobundan fazla miktarda luteinizasyon hormonu (LH) salgılanmasına neden olur. Sonuçta germinatif epitel zayıflayan bir noktadan patlar. Bu patlama aynı zamanda çevresinde engeli kalmayan ve iç basıncıda iyice artmış Graaf folikülünün patlamasına neden olur. Çevresi korona radiata ve onunda dışında birkaç sıra folikül epitelini ile sarılı olan ve 2. olgunlaşma bölünmesinin metafaz aşamasında bulunan oosit II ovaryum yüzeyine uzanan fimbriya ovarikalar ve infundibulum yardımıyla yakalanarak tuba uterina'ya gelir (Sternberg 1997, Tanyolaç 1999). Ovulasyondan kısa bir süre önce ya da ovulasyon anında primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamlar ve 23 çift yapılmı kromozom taşıyan diploit miktarda iki hücre oluşur. Birinci hücre büyüktür ve sekonder oosit adını alır. Diğer hücre çok küçüktür ve 1. polar cisim adını alır. Sekonder oosit hemen 2. mayoz bölünmeye girer ancak bölünmeyi spermiyum tarafından döllenildikten sonra tamamlar (Karaöz 2002)

İnsanda bu olay aybaşı döngüsünün ortalarında yani 28 günlük döngünün yaklaşık 14. gününde gerçekleşir. Çoğunlukla her döngüde ovaryumdan yalnızca bir oosit serbest bırakılır ancak bazen ovulasyon gerçekleşmeyebilir. Bazen de aynı anda iki ya da daha fazla oosit atılabilir ve bunların hepsi döllenildiği takdirde birden fazla fetus oluşabilir. Döllenme ovulasyon sonrasındaki ilk 24 saat içinde gerçekleşmezse, oosit bozulur ve ortadan kaldırılır (Junqueira ve ark 2006).

1.1.1.3. Korpus luteum

Hormon (östrojen) içeren likör folikülü'nün boşalması ve oosit II'nin atılmasıyla ovulasyon sonrasında Graaf folikülünün boşluğunda bir takım yapısal değişiklikler görülür. Bu anda kanda östrojen düzeyinde düşme olmuştur. Hipofizden salgılanan luteinizasyon hormonu ile luteotropik hormon (LTH) da bu yapısal değişimlerde rol oynarlar. Folikülün büzüşen boşluğu içine çeperdeki yırtık kan damarlarından kan dolar. Stratum granulozum'u oluşturan folikül epitel hücreleri farklılaşarak endokrin fonksiyonlu iri lutein hücrelere dönüşürler. Aynı zamanda büzüşüp kıvrımlanan stratum granulozum'un dışındaki teka interna hücrelerinde de benzeri değişimler görülür ve bunlar da teka lutein hücrelere dönüşürler. Bağdoku ve kılcal düzeyde kan damarları da bu hücreler arasına yayılır. Böylece iri granuloza lutein hücreleri ile onlardan biraz daha küçük olan teka lutein hücreleri tarafından Graaf folikülünün yerinde yeni bir oluşum meydana getirilir. Lipid ve

sarı lipokrom pigmenti (lutein) içeren bu hücrelerin şekillendirdiği oluşum korpus luteum'dur. Bu endokrin bir organ olup lutein hormonu (progesteron) salgılar ayrıca buradan oksitosin de salgılanır. Ancak korpus luteum az da olsa östrojen de salgılar ve bu suretle hipofiz'den tekrar folikülü stimüle eden hormon (FSH) ve LH sekresyonu önlenir. Korpus luteum etkinlik gösterdiği sürece kanda progesteron düzeyi yüksek kalır ve ovaryum dinlenme sürecine girer ayrıca folikül gelişmeleri olduğu gibi durur. Çiftleşme sonucunda tuba uterina'ya kadar ulaşan spermiyumlar, ovulasyonla atılan oosit II'yi yakalayabilirse döllenme olur ve yeni bir canlı da yaşama ilk adımını atar. Bu durumda ovaryumda oluşan korpus luteum çok gelişir ve gebelik süresince varlığını sürdürür (Ross ve ark 1995, Tanyolaç 1999), buna korpus luteum graviditatis adı verilir (Ergün ve ark 2012). Embriyonun trofoblastik hücreleri tarafından sentezlenen bir hormon olan insan koriyonik gonadotropin hormonu (HCG) korpus luteumu uyaran sinyaller gönderir. İnsan koriyonik gonadotropin hormonunun etkisi LH'ye benzerdir böylece korpus luteumun bozulması engellenir (Junqueira ve ark 2006). Ancak, gebeliğin ikinci yarımından itibaren korpus luteum fonksiyonlarına plasenta da katkıda bulunur. Gebelik olmadığı takdirde sadece belirli siklus dönemlerinde gelişme gösteren ve fazla büyümeyen korpus luteum oluşur (Tanyolaç 1999), buna da korpus luteum periyodikum denir (Ergün ve ark 2012). Gebeliğin sona ermesi ya da yeni bir siklusun başlamasıyla bu oluşumların yerinde büyük bir nedbe dokusu şekillenir. Korpus luteumların yerinde oluşan bu beyazımsı nedbe dokusuna korpus albicans denir. Korpus luteum'un yıkımında endometriumda sentezlenen ve aniden serbest bırakılan prostoglandin'in etkisi söz konusudur (Tanyolaç 1999).

1.1.1.4. Östrus siklusu

Korpus luteum'un yıkımının ardından hipofizden salınan FSH ovaryumu yeni folikülleri geliştirme yönünde uyarır. Korpus luteum'un yıkımıyla da kanda progesteron düzeyi düşer ve ovaryumda sürüp giden ve zincirleme olarak birbirini izleyen bu olaylar ovariyel siklusu oluşturur. Bu siklus, ovaryum hormonları ile hipofizden salınan gonadotropik hormonların karşılıklı etkileşmeleriyle düzenli olarak sürüp gider. Gebe kalınmadığı takdirde insanda bu siklus normal olarak 28 günde bir tekrarlanır (Tanyolaç 1999). Bu periyodik değişiklikler evcil memelilerde hayvan türlerine göre özellikler gösteren devreler (proöstrus, östrus, meöstrus, diöstrus ve anöstrus) halindedir ve östrus siklusu adını alır (Hassa ve Aştı 2003).

1.1.1.4.1. Proöstrus

Bu devrede adenohipofizden salgılanan FSH'nın kontrolü altında foliküler gelişim başlar ve ovaryumda bir önceki döneme ait korpus luteum geriler (Erdost 2010). Graaf follikülünün teka internası ve granüloza hücreleri östrojen salgırlar. Östrojenik hormonun etkisi altında dışının seksüel heyecanında artma gözlenir. Bu hormon tuba uterina ve uterus epitelinde silyum oluşmasını stimüle eder, endometriyumda vaskülarizasyon artar (Hassa ve Aştı 2003) ayrıca uterus mukozasının yüksekliği ve yüzey epitelleri hacim olarak artar. Bu değişiklikler daha az oranda vajinada da meydana gelir. Bu dönemde progesteron seviyesi düşer, hipofizden FSH salınımı ve östrojen seviyesi de giderek artar (Erdost 2010).

1.1.1.4.2. Östrus

Ovulasyonun meydana geldiği devredir. Gelişmesini tamamlamış olgun foliküllerden biri patlar ve yumurta hücresi ovaryumdan atılır (Hassa ve Aştı 2003). Östrojen en üst seviyededir, hipofizden FSH salınımı azalarak LH ile luteotropik hormon üretimi ve salınımı artar (Erdost 2010). Tuba uterina ve endometriyumda vaskülarizasyon ile sekresyon artar. Miyometriyumda kalınlaşma gözlenir. Vajina genişler, hiperemiktir ve inek dışında diğer hayvanların çok katlı yassı epitel hücrelerinden ibaret olan vajina epitelinin yüzlek hücrelerinde kornifikasyon görülür. İnekte ise, bu epitel çok katlı prizmatiktir (vajinanın ön kısmında) ve östrusta bu prizmatik hücreler mukus salgılar (Hassa ve Aştı 2003).

1.1.1.4.3. Metöstrus

Bu devre ovaryumda korpus luteum'un şekillenmesi ile karakterizedir. Progesteron düzeyi yükselir ve östrojen minimum düzeye düşer. Uterus epiteli kısmen dökülür ve bazı türlerde (örneğin dişi köpekte) hafif bir hemoroji de görülür (Hassa ve Aştı 2003). Bu kanama inekte de oldukça az görülebilir. İnekte 1-3. günler arasında görülür (Erdost 2010). Vajinal smear çok sayıda lökosit ve az sayıda kornifiye olmamış hücreleri içerir (Hassa ve Aştı 2003).

1.1.1.4.4. Diöstrus

Östrus siklusunun en uzun devresidir. Korpus luteum'un salgıladığı progesteron hormonunun etkisiyle uterus bezleri uzar ve kıvrımlı bir hal alırlar. Gerek mukoza bezleri

gerekse bez epitelleri yüksek prizmatik şekillidir ve uterus sütü adı verilen bir salgı salarlar. Endometriyum vaskülarizasyonunun artması ve bezlerin gelişmesiyle iyice kalınlaşır. Bu durum döllenme olduğu taktirde gelişerek devam eder. Döllenme olmadığında ise, korpus luteum'un gerilemeye başlaması ve progesteron düzeyinin düşmesiyle uterus bezleri kısalır, sekresyon azalır, mukoza incelir ve büzüşür (Hassa ve Aştı 2003). Diöstrus korpus lutem gerileyinceye kadar devam eder. Vajina epitelinde salgı aktivitesi diöstrusun sonunda azalmaya başlar (Erdost 2010).

1.1.1.4.5. Anöstrus

Seksüel aktivitenin olmadığı uzun bir dönemdir. Bazı hayvanlarda görülen bu dönem oldukça uzun bir dinlenme sürecidir. Bu dönem ineklerde görülmez, inekler gebe kalmadıkları süre içinde 21 günde bir östrus gösterirler. Köpeklerde ise bu dönem yaklaşık 2 aylık bir süreci kapsar (Erdost 2010).

1.1.2. Tuba Uterina

Ovulasyonda atılan oosit II'yi içine alan, fertilizasyon için uygun ortam oluşturan, zigotun uterusu yollanmasına ve bu sırada beslenmesini sağlayan 12-15 cm uzunluğundaki tüp biçimli musküler yapılardır (Paker 1993).

Anatomik olarak 4 bölümü vardır:

İfundibulum: Huni biçiminde ve peritona açılan geniş bölümdür. Serbest kenarında parmak şekilli çıkıntılar (fimbria) bulunur. Fimbrialardan bir tanesi çok gelişmiştir, ovaryuma çok yakın bulunur ve ovarian fimbria adını alır.

Ampulla: İnce duvarlı, kıvrımlı, istmus bölümüne göre çapı daha geniş olan, infundibulumun açıldığı tübüler bölümdür. En uzun segmenttir. Tubanın yaklaşık 2/3'ünü oluşturur.

İstmus: Oldukça kısa olan istmus'un çapı ampulladan daha dar, fakat duvarı daha kalındır.

İntramural bölüm – Pars interstisyalis: Tubanın uterus duvarı içindeki 1 cm kadarlık bölümüdür. Tubanın duvar kalınlığı uterusu doğru giderek arttığı halde, lumen çapı tersine azalmaktadır (Paker 1993).

Tuba uterinanın duvar yapısı üç katlıdır ve lumenden itibaren sırasıyla tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olarak adlandırılır.

Tunika mukoza, lumene uzanan plikalar yapar. Bu plikalar uterusu gidildikçe kısalır ve daha az dallanma gösterirler. En uzunları tuba uterinanın başlangıç bölümünü oluşturan ampulla bölümündedir. Bu uzun plikaların bir kısmı tüpün ucundan saçak saçak dışarıya çıkarlar ve ovaryum yüzeyine uzanırlar (fimbriya ovarika). Lamina epiteliyalis tek katlı prizmatiktir. Uterus'a doğru epitel hücrelerinin yükseklikleri azalır. Bu hücrelerin bir kısmı kinosilyumludur (silyumlu hücreler). Titrek tüylerin ritmik hareketi sayesinde ve oluşturulan bir sıvının da yardımıyla oosit II ya da embriyo uterusu doğru iletilir. Silyumsuz hücrelerin (sekretorik hücreler) sitoplazmalarında salgı granülleri bulunur. Bu salgı, oositin ya da embriyonun korunmasına ve beslenmesine yardım eder. Ampulla'da yumurta hücresinin bulunması halinde (ovulasyon sonrasında) sekretorik hücrelerin sayısı artar. Oysa foliküllerin oluşması döneminde (ovulasyondan önce) silyumlu hücreler çoğunluktadır (Tanyolaç 1999). Bu hücrelerde salgı yapımı, salgının verilmesi ya da silyum sayısının artması-azalması hormonal sıklusa bağlıdır. Östrojenin etkisi ile salgı yapımı hızlanır, silyum sayısı artar ayrıca progesteronun etkisiyle salgının lumene verilmesi ve silyumların hareketliliği hızlanır (Erdost 2010). Lamina propriya gevşek bağdoku yapısındadır. Lamina muskularis yoktur (Erdost 2010).

Tunika muskularis, genellikle içte sirküler ve daha geniş bir alanı kaplayan dışta ise, longitudinal yönlü düz kas hücrelerinden oluşur. Kaslar sinirsel kontrol altında olduğu gibi, hormonal etki altında da bulunurlar (Paker 1993) ve uterusu yönelik peristaltik hareketleriyle yumurta hücresinin ya da embriyonun ilerlemesine yardımcı olurlar. Tunika seroza peritonun visseral yaprağıdır (Tanyolaç 1999).

1.1.3. Uterus

Memelilerde yavrunun geliştiği organdır. İnsanda basit yapıda bu organ hayvanlarda ikiye çatallanır, yani iki boynuzludur (Tanyolaç 1999). İnsanlarda anatomik olarak fundus, korpus, istmus ve serviks olmak üzere 4 bölümden oluşur (Paker 1993). Bütün boşluklu organlarda olduğu gibi uterusun duvar yapısı da üç kattan oluşur, bunlar; tunika mukoza (endometriyum), tunika muskularis (miyometriyum) ve tunika seroza (perimetriyum)'dır (Fawcett 1993).

Lamina epiteliyalis; insan, tek parmaklı ve etçillerde tek katlı prizmatiktir. Gevişgetirenlerde ve domuzda yalancı çok katlı prizmatik epitel örtüsü ile örtülüdür. Gerek tek katlı gerekse yalancı çok katlı prizmatik epitel hücrelerinin bir kısmı kinosilyumludur. Silyum içermeyen hücrelerin sitoplazmalarında salgı granülleri bulunur. Hareketleri vajinaya yönelik olan olan silyumlar, özellikle insanda siklusun son yarımında görülür (Tanyolaç 1999). Ancak sinematografik incelemelerde bazı silyumların ovaryuma doğru hareket ettiği de gözlenmiştir. Bu durumun spermin tuba uterinaya doğru hareketini kolaylaştırdığına inanılmaktadır (Paker 1993). Lamina propriya; fibroblastlardan, makrofajlardan, mast hücrelerinden zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır (Ergün ve ark 2012). Lamina propriya içerisinde uterus bezleri bulunur. Bunlar yer yer dallanma gösteren basit tübüler bezlerdir. Siklusa bağlı olarak bu bezler değişik görünüm kazanırlar (Sternberg 1997). Bu bezler çok sayıda sekresyon yapan silyumsuz mikrovilluslu hücrelerden oluşmaktadır. Ovulasyona yakın dönemde proliferasyon hızı artarken, ovulasyondan sonra ise uterus bezleri salgı yapmaya başlar (Ergün ve ark 2012). Gevişgetirenlerde lamina propriya'nın bez içermeyen bölgeleri vardır. Bunlar gebelikte düğme şeklinde çok belirgin oluşumlara dönüşürler, plasentanın maternal yarımını oluşturan bu yapılara karunkula denir. Uterus bezlerinin bazal yani miyometriyuma bakan üçte birlik bölümünü içinde barındıran bağdoku (endometriyum bazalis) fibroz karakterdedir ve kan damarlarından zengindir (Tanyolaç 1999). Lamina muskularis ve submukoza katmanları bulunmaz (Ergün ve ark 2012). İnsanda lamina propriyanın geri kalan yüzlek bölümü (endometriyum fonksiyonalis), 28 günde bir tekrarlanan periyodik değişiklikler gösterir. Yaşlılıkta endometrium atrofiye uğrar ve incelir. Bez ağzıları kısmen kapanarak salgı birikimi sonucu küçük kistlere dönüşür (Paker 1993).

Tunika muskularis, uterus duvarının en kalın katmanını oluşturur. Organizmadaki en uzun düz kas hücreleri buradadır. Düz kas hücreleri içte sirküler yönlüdür ve daha kalın bir katman oluştururlar. Dışta bulunan katman ise longitudinal yönlü kas hücrelerinden şekillenir ve daha incedir. Bu iki kas katmanı arasında bol miktarda kan damarı bulunur. Kan damarlarından zengin olan bu bölgeye stratum vaskulare denir (Garther ve Hiatt 1997). Gebelik sırasında miyometriyum hem hiperplazi hemde hipertrofi sonucu çok büyür. Gebelik sırasında pek çok düz kas hücresi protein salgısı yapan hücrelerin ince yapı özelliklerini gösterir ve aktif olarak kollajen sentezler (Junqueira ve ark 2006). Gebelik sırasında miyometriyal kontraksiyonların baskılanması ovaryum ve plasentadan salgılanan

bir peptid hormon olan relaksin'in kontrolü altındadır (Abraham 2006). Gebelik sonrasında bazı düz kas hücrelerinde bozulmalar görülür, bazılarının boyutları azalır ve kollajen enziminin etkisiyle yıkılırlar. Böylece uterusun boyutları gebelik öncesine yakın ölçülere iner (Junqueira ve ark 2006). Tunika serosa mezotel hücreleriyle döşenmiş gevşek bağ dokulu katmandır (Ergün ve ark 2012).

1.1.3.1. Endometriyal siklus

Ovaryum siklusu ile eş zamanla ve ovaryumdan salgılanan hormonlara (östrojen, progesteron) bağlı olarak uterus endometriyumu yapısal ve işlevsel değişimler gösterir. Bu periyodik olaya 'uterus (endometriyal) siklusu' denir. Dört evreden oluşur:

1. Proliferasyon evresi (Foliküler evre; 5-14 günler arası)
2. Sekresyon evresi (Progestasyonel evre; 14-27 günler arası)
3. İskemi evresi (27-28 günler arası)
4. Menstruasyon evresi (1-5 günler arası) (Karaöz 2002).

1.1.3.1.1. Proliferasyon evresi

Siklusun 5-14 günleri arasında olaylanır. Menstruasyon sonunda başlar ve ovulasyona kadar sürer. Menstruasyon evresinin sonunda uterusun endometriyum fonksiyonals tabakası dökülmüş ve geriye sadece bazal tabaka kalmıştır. Uterusun bazal tabakasında uterus bezlerinin bazal kısımları ve spiral arterlerin alt kısımları bulunur. Endometriyumda proliferasyon evresi yaşanırken, aynı dönemde ovaryumlarda FSH uyarımı ile foliküller gelişmekte ve östrojen hormonunu salgılamaktadırlar (granüloza ve teka interna hücreleri tarafından) (Karaöz 2002). Foliküler evre, 6-12 oositin gelişmesiyle başlar. Bu gelişme FSH'a bağımlıdır. Siklusun 6. gününde yalnızca bir folikül gelişimini sürdürür, diğerleri ise atreziye uğrar (Abraham 2006). Ayrıca endometriyum kalınlaşır. Bu kalınlaşma bağdoku hücrelerindeki ve temel maddedeki artış sonucu lamina propriyanın genişlemesi ve uterus bezlerinin büyümesiyle olur. Bağdoku katmanı genişlediği için çok uzayan uterus bezleri lamina propriya'ya sığabilmek için kıvrımlar yapar (Ross ve ark 1995).

1.1.3.1.2. Sekresyon evresi

Siklusun 14-27. günleri arasındaki dönemdir. Bu evrede, 15. günde ovulasyon olmuş ve oosit II'nin atılmasından dolayı korpus luteum oluşmuştur (Karaöz 2002). Bu dönemde uterus bezleri salgı yapmaya başlar. Bez epitel hücrelerinin sitoplazması ve bezlerin lumeni salgı ile dolarak daha hacimli bir görünüş kazanır ayrıca bezler daha da kıvrımlı bir durum alırlar. Kılcal damarların geçirgenliği bu dönemde çok arttığı için lamina propriya ödemli görülür (Tanyolaç 1999). Spiral arterioller iyice uzayarak endometriyumun yüzeyine kadar ulaşırlar. Bez hücreleri glikojenden zengin salgı salgılayarak bezlerin lumenlerini doldurur (Karaöz 2002). Şayet yumurta yolunda döllenme olmuşsa çevresi trofoblastlardan oluşan embriyo, bu şekilde değişim gösteren endometriyuma implante olur (Tanyolaç 1999). Endometriyum bezlerinin arasında yerleşim gösteren hücreler, büyüyüp gelişirler ve glikojen ile lipid depolayarak desidua hücrelerine dönüşürler (Karaöz 2002).

1.1.3.1.3. İskemi evresi

Siklusun 27-28. günleridir. Eğer döllenme olmamışsa korpus luteum 14 gün aktif kalır ve bu süre sonunda hormon salgılamayı durdurur (Karaöz 2002). Endometriyumu'nun bazal bölümündeki spiral arteriollerin sürekli kontraksiyonu nedeniyle endometriyum'un yukarı bölümlerine kan gitmez. Bunun sonucunda da, beslenemeyen tüm oluşumlarda nekroz başlar (Fawcett 1993). Bezler salgılama yapamaz ve endometriyum sudan yoksunlaşır ve büzülür (Karaöz 2002).

1.1.3.1.4. Menstruasyon evresi

Siklusun 1-5. günleridir. İskemiden sonra endometriyum fonksiyonals nekroze olur ve spiral arteriollerin yırtılması ile kan ve bez artıkları vajinadan dökülmeye başlar. Buna menstruasyon kanaması ya da adet görme denir. Dökülme bazal tabakaya kadar sürer (Karaöz 2002).

1.1.3.2. Serviks uteri

Uterusun vajinaya bağlanan en dar bölümüdür. Lamina epiteliyalis'i tek katlı pirizmatiktir. Lamina propriyası sadece insanda ve etçillerde mukus salgılayan dallı tübüler bezler içerir. Diğer hayvanlarda epitel katı oluşturan pirizmatik hücreler holokrin salgılama biçiminde servikal mukusa dönüşürler. Mukoza lumene kadar uzanan kıvrımlara

(pilikalara) sahiptir. Servikte çok güçlü bir kas katmanı bulunur. Kaslar gebelikte serviks için tıkaçıcı bir halka biçiminde görev görür ve gebeliğin sonuna kadar serviksin kapalı kalmasını sağlayarak fetal gelişimin güvenliğini üstlenir. Serviksin ağız kısmının kapalı tutulmasında mukus kitlesinin de büyük payı vardır. Servikal mukusun içinde bulunan kalikrein enzimi spermiyumların hareketini artırır (Tanyolaç 1999). Ovulasyon sırasında müköz salgılar sulanır ve spermin uterusu girmesine olanak sağlanır. Luteal fazda ya da gebelikte progesteron düzeyleri, müköz salgıları değiştirerek daha virküz bir hal almasına neden olur ve böylece uterus gövdesine spermin ve mikroorganizmaların geçişi engellenir. Doğumdan önce servikte görülen genişleme ise şiddetli kollajenolizise ve bunun yol açtığı yumuşamaya bağlıdır (Junqueira ve ark 2006). Tunika muskularis içte sirkular dışta longitudinal düz kas tabakasından ibarettir. İçte yer alan sirküler katman elastik ipliklerden zengindir. Bu kaslar doğum anında önemli derecede gevşer. Hem kas hem de elastik iplikler doğumdan sonra serviksin eski yapısına dönmesine yardımcı olur. Tunika seroza gevşek bağ doku yapısındadır (Erdost 2010).

1.1.4. Vajina

Çiftleşmenin gerçekleştiği organ olup tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya katmanlarını içerir. Kutan mukoza yapısındadır. Lamina epiteliyalis genel bir değişle çok katlı yassıdır (Garther ve Hiatt 1997). Ancak bu çok katlı yassı epitel durumu özellikle evcil hayvanlarda ovulasyona denk gelen östrus dönemi ve bir de anöstrus için geçerlidir. Ayrıca östrus evresinde yüzlek hücrelerin keratinleşmesi söz konusudur. Gebelik durumunda çok katlı yüzlek epitelin hücreleri kübik ya da prizmatik olurlar. Ayrıca gebelikte ve özellikle de gebeliğin son dönemlerinde lamina epiteliyalisin kalınlığı azalır. Bu ayrıntılardan yararlanarak vajinadan hazırlanan froti ve biyopsi preparatlarının incelenmesiyle seksüel siklus saptanır. Lumende vajinayı kayganlaştıran süt kıvamında ve kuvvetli asit reaksiyonda bir salgı bulunur (Tanyolaç 1999). Östrojen uyarısı ile vajina epiteli büyük ölçüde glikojen sentezleyip biriktirir. Vajinal hücrelerin dökülmesiyle bu glikojen vajina epitelinde depolanır. Vajinadaki bakteriler glikojeni dönüştürerek vajinanın genelde düşük olan pH'sından sorumlu laktik asidi oluştururlar. Vajinadaki asidik ortam bazı patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu bir etki sağlar (Junqueira ve ark 2006).

Lamina propriya hücrelerden zengindir. Submukoza gevşek bağdoku yapısındadır ve bez içermez (Tanyolaç 1999). Vajina mukozası neredeyse duyusal sinir

sonlanmalarından yoksundur, bulunan birkaç çıplak sinir sonlanması ise muhtemelen ağrı algılayan sinir lifidir (Junqueira ve ark 2006). Tunika muskularis içte sirküler, dışta ise longitudinal yönlü düz kas hücrelerinden oluşur. Tunika adventisya organı dıştan sarar ve fibröz bağdoku yapısındadır (Fawcett 1993, Tanyolaç 1999).

1.1.5. Vulva (Dış Genital Organlar)

Bu kısımda vestibulum vajina, labiyumlar ve klitoris gibi oluşumlar yer alır.

1.1.5.1. Vestibulum vajina

Labiyumların arasında kalan vajina ve dış üretranın açıldığı dar bir aralıktır. Vestibulum vajina vajinadan himen ile ayrılmıştır (Erdost 2010). Üretra buraya açılır. Lamina epiteliyalis çok katlı yassıdır. Lamina propriya'da bez bulunmaz. Submukozada bezler vardır. Bunlar dallı, tübüler yapı gösteren glandula vestibularis minorislerdir. İnsan, gevişgetiren ve kedide aynı yapıda olan glandula vestibularis mayorisler (Bartholin bezleri) de bulunur (Tanyolaç 1999). Bu bezler erkekteki bulboüretal bezlerle benzerdir. Bu bezlerde sıklıkla yangı gelişir ve son derece ağrılı kistler oluşur (Junqueira ve ark 2006). Bu bez grupları müköz salgı yaparlar. Vestibulum vajina'da vajinadan gelen düz kaslara iskelet kasları da eşlik eder (Tanyolaç 1999).

1.1.5.2. Labiyumlar

Evcil hayvanların çoğunda, sadece insanların labiyum minörüne karşılık gelen bir çift deri kıvrımıdır. İnsanlarda ise, pubisten aşağı doğru uzanan iki büyük deri kıvrımı yanında iki küçük deri kıvrımı daha vardır. Bunlar labia major ve minör olarak tanımlanır (Erdost 2010). Labia minörler içinden elastik liflerin geçtiği süngerimsi bir bağ dokudan oluşan deri kıvrımlarıdır. Bunları örten çok katlı yassı epitelin yüzeyinde ince bir keratinize hücre katmanı bulunur. Labia minörlerin iç ve dış yüzeylerinde yağ ve ter bezleri bulunur. Labia majörler, bol miktarda yağ dokusu ve ince bir düz kas tabakası içeren deri katlantılarıdır. İç yüzeylerinin histolojik yapısı labia minörlere benzerdir. Dış yüzey kaba, kıvrımlı kıllar içeren deriyle örtülüdür. Yağ ve ter bezleri her iki yüzeyde de çok sayıda bulunur (Junqueira ve ark 2006).

1.1.5.3. Klitoris

Klitoris ve penis embriyonik köken ve histolojik yapı bakımından benzerdir (Junqueira ve ark 2006). Klitoris; gövde (erektile dokudan), glans klitoris ve glans'ı örten prepusyumdan ibarettir. Gövde bölümü kan damarlarından zengin bir bağ dokudan oluşur, yağ doku ve düz kas hücrelerini içerir. Erektile dokunun miktarı türlere göre farklıdır (Erdost 2010). Glans klitoris insan, köpek ve tek parmaklılarda gerçek bir korpus kavernozum'a (korpus kavernozum klitoridis) sahiptir. Diğer hayvanlarda bu erektile dokunun yerini damardan zengin bir bağ doku alır. Bu oluşumun üzerini küçük, kılsız bir deri kıvrımı (prepusyum) örter (Tanyolaç 1999). Prepusyum erkeklerde olduğu gibi pariyetal ve visseral yapraklara sahiptir (Erdost 2010). Epidermis katmanının altındaki bağ dokuda tek tük serbest yağ bezi ve deri reseptörleri olarak çok sayıda genital duyu cisimcikleri bulunur (Garther ve Hiatt 1997, Tanyolaç 1999).

1.2. Dişi Genital Sistemin Gelişimi

Bir canlının gelişimi, üreme hücrelerinin fertilizasyonla oluşturdukları seks kromozomlarının kombinasyonu (XX veya XY) ile belirlense de erkek veya dişi gonadlarına ait morfolojik özellikler, gelişimin belirli bir evresine kadar ayırt edilemez. Bu sürece 'indifferent safha' denir ve bu safhadaki gonadlara da 'indifferent gonad' adı verilmektedir (Gürsoy ve Toptagel 1997). Gonadların bu durumuna uygun olarak başlangıçta dişi ve erkekte dış genital organlar da birbirine benzer görünüştedir. Böylece cinsiyet her ne kadar döllenme ile gerçekleşmişse de henüz bu durum anatomik olarak belirgin değildir (Petorak 1986).

1.2.1. Farklılaşmamış Gonad

Gonadlar posterior abdominal hattaki mezotelyum, alt mezenkim ve primordial cinsiyet hücrelerinden oluşan üç yapıdan köken alırlar (Gürsoy ve Toptagel 1997). Gonadal gelişimin ilk belirtileri, mezonefrozun medialinde mezotelde bir kalınlaşma ile meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık oluşur. Parmak şeklindeki epiteliyal kordonlar (primer seks kordonları), alttaki mezenşimin içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklılaşmamış gonad dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklılaşmamış gonadın korteksi over'e farklılaşır,

medullası ise geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekte ise, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur (Moore ve Persaud 2002).

1.2.2. Primordial Cinsiyet Hücreleri

Her iki cinsin ilkel seks hücreleri olan primordial cinsiyet hücreleri yuvarlak ve 25-30 mikron çapındadır. Yuvarlak ve büyük çekirdek, belirgin bir veya birkaç çekirdekçik içerirler. Periferik sitoplazmaları yüksek alkalik fosfatase aktivitesini gösterir. Bol glikojen partikülleri ile çok sayıda lipid damlacıkları içeren sitoplazmaları yalancı ayak benzeri düzensiz uzantılara sahiptir (Gürsoy ve Toptagel 1997). Primordial cinsiyet hücreleri, gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin allantois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle primitif gonadlara ulaşırlar ve genital sırtları işgal ederler. Bu hücreler genital sırtlara ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testis farklılaşmasında primordial cinsiyet hücrelerinin indükleyici rolü vardır (Sadler 2005). Primordial cinsiyet hücrelerinin ortaya çıktığı ilk yerden, plika genitalis'e kadar uzanan yola gonad yolu denir (Petorak 1986). Hücreler gerek göçleri sırasında gerekse ilkel gonadlara ulaştıktan sonra mitoz bölünme ile çoğalırlar (Gürsoy ve Toptagel 1997).

1.2.3. Ovaryumların Gelişimi

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş olur. Primer seks kordonları belirgin değildir, medulla içerisine doğru sokulurlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Bu oluşan yapı ve primer seks kordonları erken fetal periyotta overin yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epitel mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordial cinsiyet hücreleri onların içerisine girer. Bu kordonlar izole hücre kümelerine parçalanırlar, oluşan primordial foliküllerin her biri primordial cinsiyet hücrelerinden köken alan bir oogonyum içerir. Oogonyumlar primer seks kordonlarından gelişen, tek tabakalı yassı foliküler hücreler ile sınırlandırılmıştır (Moore ve Persaud 2002). Fetal hayatta oogonyumların birbirini izleyen mitozları ile binlerce primitif cinsiyet hücresi oluşur. Doğumdan önce birçok oogonyum dejenere olmasına rağmen geriye 2 milyon civarında oogonyum kalır ve büyüyerek primer oosit adını alırlar. Doğumdan hemen sonra yüzey epiteli tek tabakalı

yassı bir hale dönüşürler. Yüzey epiteli korteksteki foliküllerden tunika albuginea adı verilen ince fibröz bir kapsülle ayrılır. Ovaryum gerileyen mezonefrozdaki bağımsız hale gelirken, mezovaryum adı verilen kendi mezenteri ile asılı kalır (Gürsoy ve Toptagel 1997). Ovaryumlar olduğu yerden tuba uterinalarla beraber sağ ve sola doğru yayılırlar ve esas yerlerine yerleşirler (Petorak 1986).

1.2.4. Dişi Genital Kanalların ve Bezlerin Gelişimi

Dişi genital yollarının çoğunluğu paramezonefrik duktuslar tarafından oluşturulur. Tuba uterinalar, paramezonefrik duktusların birleşmemiş kranial bölümlerinden gelişir (Moore ve Persaud 2002). Bunların kaudal kısımları da uretus kanalını oluşturmak üzere kaynaşırlar. Duktusların kaudal birleşmiş haldeki paramezonefrik kanallarının lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan kıvrım, uterusun broad ligamentidir ve uterus ile broad ligamentler, pelvisi uterorektal poş ve uterovesikal poş olarak ikiye böler. Kaynaşan paramezonefrik kanallardan uterusun korpusu ve serviksi gelişir. Bunların etrafı; endometrial stromayı, miyometriyum ve perimetriyum meydana getiren bir mezenşim tabakası ile sarılıdır. Paramezonefrik kanalın solid ucunun ürogenital sinusa ulaşmasından hemen sonra, sinusun pelvik parçasından sinovajinal bulbus adı verilen çıkıntılar belirir ve hızlıca prolife olarak solid vajinal plağı oluştururlar. Proliferasyon plağı kranial uca devam ederek, uterus ile ürogenital sinus arasındaki mesafeyi uzatır (Sadler 2005). Daha sonra vajinal plağın merkezi hücreleri parçalanır ve vajina lumeni oluşur. Periferik hücreler vajinal epiteli oluştururlar (Moore ve Persaud 2002). Üretra'dan ayrılan tomurcuklar çevre mezenkim içine doğru büyürler ve üretral bezler ile paraüretral bezleri oluştururlar. Ürogenital sinus'tan ayrılan çıkıntılar ise, Bartholin bezlerini yaparlar (Gürsoy ve Toptagel 1997).

1.2.5. Dişi Dış Genital Organların Gelişimi

Dişilerde dış genital organların gelişimi östrojenlerin denetimi altındadır (Sadler 2005). Bu östrojenler fetal overler ve plasenta tarafından üretilmektedir (Moore ve Persaud 2002). Genital tüberkül ventral yönde kıvrılır ve klitoris şeklini alır. Labioskrotal kabartılar labia majörleri, üretra kıvrımları ise labia minörleri meydana getirir (Drews 2000). Ürogenital oluk vestibulum vajina'yı oluşturur (Kayalı ve ark 1992). Dişi üretrası ise; ürogenital sinus'un daha kranial bölümünden gelişmektedir (Carlson 2004).

1.3. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) insülinin eksikliğine, yokluğuna veya etkisizliğine bağlı olarak hiperglisemi ile birlikte bazı hümorale ve dokusal belirtileri kapsayan hastalık tablosunun adıdır (Öbek 1990). Bu hastalık her yaşta görülebilen, ülkemizde ve dünyada giderek hızla artan, sürekli tıbbi bakım gerektiren, tedavi maliyeti çok yüksek olan ve önemli komplikasyonları nedeniyle çok sorun yaşatan bir endokrin hastalıktır (Çıtıl ve ark 2010).

1.3.1. Diyabetin Sınıflandırılması

1.3.1.1. Tip 1 diabetes mellitus

Tip 1 diyabet genetik olarak duyarlı bir kişide bazı çevresel maddelerin (bakteriyel, kimyasal, diyetle bağlı) otoimmün tepkiyi tetiklediği bir hastalıktır (Carpenter 2002). Genellikle pankreatik beta hücrelerine karşı gelişen antikorlarla beta hücreleri yıkıma uğrar (Hough ve ark 2001) böylelikle endojen insülin salgısının çok az olması veya hiç olmaması ile karakterizedir (Andreoli ve ark 1993). Bu diyabet türü şiddetli hiperglisemi ile birlikte, ani gelişen, insülin ile tedavi olmazsa ilerleyip ketoasidoz ve ölüme yol açan bir hastalıktır (Aral 1998). Ketoasidoz ve ölüme engel olmak için insülini dış kaynaklardan yerine koyma gereği vardır (Andreoli ve ark 1993). Diyabetin başlamasından sonra hastalarda birkaç hafta veya ay süren bir ‘balayı dönemi’ görülür. Bu dönemde, hastalarda glikoz metabolizması normalleşir. Daha sonra hastalık tekrar ortaya çıkar ve yaşam boyu insülin tedavisi gerekir. Bu nedenle tip 1 diyabet, insüline bağımlı diyabet olarak da isimlendirilmektedir (Aral 1998).

Tip 1 diyabetin başlama yaşı, en sık olarak 11-13 yaşları arasındadır ve puberte başlangıcı ile aynı döneme rastlar. Bununla birlikte; hastalık yaşlılık dönemi de dahil olmak üzere herhangi bir yaşta başlayabilir (Andreoli ve ark 1993). Hastalar zayıftır ve tedaviden sonra bile şişmanlığa eğilim azdır. Aşırı hiperglisemi olduğundan tanıda zorluk çekilmez. İnsülin tedavisi uygulanmazsa ketozis semptomları ortaya çıkar. Bu hastalar oral antidiyabetik ilaçlara cevap vermezler ve otopsilerde beta hücre yetmezliği görülür (Aral 1998).

Hastalarda, hiperglisemiye bağlı ozmotik diürez sonucu idrara çıkma artmıştır. İdrarda glikozun yanı sıra su ve elektrolit kaybı da vardır. Hiperozmolar durum nedeniyle susama hissi mevcuttur. Görme bulanıklığı, lens ve retinanın hiperozmolar sıvılara maruz kalması sonucunda gelişir. Normal ya da artmış iştaha rağmen ortaya çıkan kilo kaybı subakut gelişen hastalıkta sık görülür. Kilo kaybı başlangıçta su, glikojen ve trigliserid azalmasına bağlıyken daha sonra aminoasitlerden glikoz ve keton cisimcikleri yapılması sonucu kas kaybı da olaya eklenir. Plazma volümünün azalması ortostatik hipotansiyona ve bunun semptomlarına neden olur. Total potasyum kaybı ve kas protein katabolizması nedeniyle güçsüzlük ortaya çıkar. Periferik sinirlerin geçici disfonksiyonuna bağlı pareteziler gözlenebilir (Candan 2003).

1.3.1.2. Tip 2 diabetes mellitus

Önceden insüline bağımlı olmayan bu tip diyabette; insülin rezistansı, rölatif bir insülin eksikliği (İliçin ve ark 2005), beta hücre işlev kaybı, düzensiz hepatik glikoz üretimi ve anormal barsak insülin emilimi vardır (Carpenter 2002). Genellikle erişkinlerde herhangi bir yaşta gelişebilir (Runge ve Greganti 2009). Hastalar tamamen asemptomatik olabilirler. Semptomatik olanlarda poliüri, ağız kuruluğu ve polidipsi vardır. Kaşıntı, halsizlik, vulvovajinit ve görme bozuklukları diğer semptomlar arasında yer alır. Hastalarda hafif hipertansiyon görülebilir (Candan 2003).

Bu kişiler başlangıçta ve sıklıkla hayat boyu yaşamak için insülin tedavisine gereksinim duymazlar. Bu tip hastaların çoğu obezdir ve obezitenin kendisi de bir miktar insülin rezistansına neden olur. Obez olmayanların da daha çok abdominal bölgede olmak üzere vücut yağ yüzdesi artmış olabilir. Bu diyabet tipinde ketoasidoz çok nadir görülür ve genellikle infeksiyon gibi başka bir hastalığa bağlı stres nedeniyle oluşur. Bu tip diyabet, hipergliseminin kademeli olarak artış göstermesi ve başlangıçta klasik semptomların hasta tarafından hissedilecek kadar şiddetli olmaması nedeniyle sıklıkla uzun yıllar tanılanmayabilir. Ancak bu hastalar makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların gelişmesi açısından artmış risk taşırlar. Tip 2 diyabet hastalarında insülin salgısında eksiklik vardır ve bu insülin salgısı, insülin rezistansını kompanse etmek için yetersizdir. Diyabetin bu formunun gelişme riski yaş, obezite, fiziksel aktivite azlığı ile artış gösterir. Daha önceden gestasyonel diyabet hikayesi olan kadınlarda, hipertansiyon ya da dislipidemi olanlarda daha sık görülür. Sıklıkla kuvvetli bir genetik yatkınlık mevcuttur

(İliçin ve ark 2005). Birçok hastanın birinci derece akrabalarında diabetes mellitus vardır (Runge ve Greganti 2009).

1.3.2. Diyabet Tanısı

Semptomatik olarak; diabetes mellitus tanısı plazma glikoz seviyesinin açık ve kuşkuyla yer vermeyecek şekilde yüksek olması ve beraberinde poliüri, polidipsi, polifaji ve hızlı kilo kaybı şeklindeki tipik belirtilerin varlığı ile konulabilir (Berkow 1987). Semptomu olmayan bir hastada ise diyabetten şüphelenince ilk tanı koyduracak test açlık kan glikoz konsantrasyonunun ölçülmesidir. Tanı koydurucu değer, farklı günlerde en az iki kez 140 mg/dl'nin üzerinde açlık plazma glikozunun tespit edilmesidir (Aral 1998). Açlık plazma glikoz değerindeki bu yükseliş; uzun süreli açlık, komplikasyon olarak meydana gelen bazı hastalıklar, gebelik, plazma glikoz düzeyini yükselttiği bilinen bazı ilaçlar ile strese bağlı olmamalıdır (Berkow 1987).

Tanı kriterlerinden biri de OGTT (Oral Glikoz Tolerans Testi)'dir. Kilograma 1.75 g glikoz olacak şekilde kişinin vücut ağırlığına göre hesaplanan sıvı diyet, toplamda 75 gramdan fazla glikoz içermemelidir. Bu testin gerektiği gibi uygulanabilmesi için hastanın en az üç gün boyunca kısıtlanmamış yani en az 150 mg veya daha fazla karbonhidrat içeren bir diyetle beslenmesi ve normal fiziksel faaliyetlerini sürdürmesi gerekmektedir. Ayrıca hasta test öncesi 16 saati geçmemek üzere en az 10 saat aç kalmış olmalıdır. Bütün bu koşullar yerine getirildikten sonra hastanın açlık kan örneği alınır ve hastanın kilosuna göre hesaplanan glikoz, suda eritilerek 5 dakika içinde hastaya içirilir. Hastanın şekerli suyu içmeye başladığı an sıfır kabul edilerek 2 saat boyunca yarım saat aralıklarla hastadan kan örnekleri alınır. Glikoz yüklemesinden iki saat içerisinde alınan kan örneklerinin herhangi birinde ve ayrıca da ikinci saatte alınan örnekte venöz plazma glikoz konsantrasyonunun 200 mg/dl'yi bulduğu ya da aştığı değerler elde edilirse kişiye diyabet teşhisi konulur (Aral 1998). Açlık plazma glikozu 140 mg/dl'nin altında ise ve oral glikoz tolerans testi sırasında 30., 60., 90. dakikalardaki glikoz seviyeleri 200 mg/dl'yi aşarsa ve 2. saat test değeri 140-200 mg/dl arasında ise kişide 'glikoz tolerans bozukluğu' vardır. Glikoz tolerans bozukluğu olanların çoğunluğunda diyabet ilerlememekte ve diyabete bağlı mikrovasküler komplikasyonlar görülmemektedir (Andreoli ve ark 1993).

Diyabetin tanı kriterlerinde kullanılan diğer testler ise, intravevöz glikoz tolerans testi (IVGTT) ile glikolize hemoglobin testi (HbA1c)'dir. İntravevöz glikoz tolerans testi, rutin olarak kullanılan bir test değildir. Ancak araştırmalarda, glikoz kullanımının değerlendirilmesinde güvenilir sonuçlar verir. Sonuçlar (k) değeri olarak bildirilir ki, bu değer glikozun dolaşımdan temizlenmesi için gereken zamanı yansıtır. Glikolize hemoglobin testinin, hemoglobinopatisi olmayan kişilerde artması diyabetin delili olduğu kanıtlanmıştır. Bu testten elde edilen değer tanısallık açısından açlık kan glikoz düzeyi ile korelasyon gösterir. Ancak halen tanısallık bir test olarak değil, glisemik kontrol derecesi hakkında fikir vermek için kullanılır (Aral 1998).

1.3.3. Diyabet Komplikasyonları

1.3.3.1. Diyabetin akut komplikasyonları

1.3.3.1.1. Hipoglisemi

Kan şekerinin 60 mg/dl altına düşmesidir. Belirtiler hipoglisemiye kompanse etmek amacıyla salınan epinefrinin etkisine ve beyin glikozunun azalmasına bağlıdır. Epinefrin salınmasına bağlı olarak terleme, titreme, taşikardi, açlık hissi gibi belirtiler ortaya çıkar. Beynin tek besin kaynağı glikozdur ve glikoz beyinde depolanmamaktadır. Kan şekeri 60 mg/dl'nin altına düştüğünde baş dönmesi, sersemlik, solukluk, taşikardi, konuşma güçlüğü, donukluk, tremor, bilinç bulanıklığı, bayılma ve konvülsiyon ortaya çıkar, tedavide bilinç açıksa oral glikoz ya da şekerli besinler, kapalı ise glikoz enfüzyonu uygulanır (Demir 1998).

1.3.3.1.2. Diyabetik ketoasidoz

En sık tip 1 diyabetlilerde görülmekle birlikte, özellikle de akut hastalık sürecinde olmak üzere tip 2 diyabet hastalarında da görülebilir (Carpenter 2002). Hastalarda dolaşımdaki insülin seviyesinin eksikliği ile mutlak ya da rölatif glukagon fazlalığı sonucunda ortaya çıkar (İliçin ve ark 2005). Ketoasidoz; hiperglisemi, asidoz ve plazma keton yoğunluğunun yüksek olması ile karakterizedir (Andreoli ve ark 1993). Belirti ve bulgular; ani başlayan poliüri, polidipsi, iştahsızlık, bulantı, kusma, solukta aseton kokusu ve kırmızı-kuru cilttir. Tedavide sıvı elektrolit ve insülin uygulaması yapılır (Demir 1998).

1.3.3.1.3. Hiperozmolar ketonik olmayan sendrom

Hemen hemen tamamı; yaşlı, fiziksel açıdan zayıf ve serbest su girişi sınırlı olan tip 2 diyabetli kişilerde gözlenir. Patogenezi diyabetik ketoasidoz'a benzerdir ancak hipergliseminin daha belirgin olması, asidoz ve ketoneminin göreceli olarak olmaması ve dehidratasyonun daha fazla olması ile ayrılır. Serbest yağ asidi düzeyleri düşüktür bu nedenle de keton cisimcikleri saptanmaz, bulantı ve kusma nadirdir. Laktik asit düzeylerindeki yükselme doku perfüzyonunun bozulmasına bağlıdır ve diyabetik ketoasidozdan daha belirgindir. Serum insülin düzeyleri normal ya da artmış olup genelde insülin direnci saptanmıştır (Carpenter 2002). Tedavi hedefleri sıvı ve elektrolit açısından özellikle sodyum ve potasyumun düzeltilmesi, insülin ile plazma glikoz seviyesinin düşürülmesi şeklinde düzenlenir. Aşırı volüm yüklenmesini önlemek için santral venöz basınç takip edilmelidir (Candan 2003).

1.3.3.1.4. Laktik asidoz

Kanda laktatların artması, pH seviyesinin düşmesi, bilinç bulanıklığı ve hipertansiyon belirtileriyle seyreden mortalitesi yüksek bir klinik tablodur (Öbek 1990). Genellikle ciddi bir hastalığı olan bireylerde oksijen dağılımının veya kullanımının yetersizliği sonunda oluşur. Laktik asit birikimi, laktat üretimi ile kullanımı arasındaki dengenin bozulmuş olduğunu gösterir (İlçin ve ark 2005). Diyabetik ketoasidozda muhtemel şok, hipotansiyon ve keton cisimler nedeniyle laktik asit yapımı hızlanır. Dolayısıyla her diabetik ketoasidoz ve hiperozmolar komada laktik asidoz gelişebilir (Aral 1998). Diyabet hastalarında laktik asidoza götüren sebepler arasında; böbrek yetmezliği, karaciğer parenkim hastalığı, fazla alkol tüketimi ve biguanid sınıfı antidiyabetik ilaçlar kullanılması sayılabilir. Laktik asidoz; kaslarda ağrı, karın ağrısı, halsizlik, bulantı, diyare, hipotansiyon ve hipotermi gibi belirtilerle ortaya çıkar (Öbek 1990).

1.3.3.1.5. Bakteriyel/fungal (mantar) enfeksiyonlar

Enfeksiyon diyabetli hastayı komaya sokabileceği gibi kan glikoz regülasyonunu güçleştirmeye sebep olur. Hiperglisemik ortamda organizmada enfeksiyonlara yatkınlık artarken, enfeksiyonlara direnç bozulur. Glikozürinin bulunması bakteriler için kültür ortamı teşkil edip mesane fonksiyon bozuklukları ve staza yol açarak enfeksiyon riskini

arttırmaktadır. Otopsi incelemelerinde akut piyelonefrit sıklığının diyabet hastalarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Küçük görülen ve önem verilmeyen hafif enfeksiyonlar kısa zamanda ilerleyerek sepsise yol açabilir. Diyabet hastalarında ölümlerin % 6'sı enfeksiyonlardan kaynaklanmaktadır (Aral 1998). Diyabet hastalarında kandidiazis, üriner sistem ve cildin genel enfeksiyonları ile tüberküloz gibi hastalıklar sıktır (Hough ve ark 2001).

1.3.3.2. Diyabetin kronik komplikasyonları

Diyabetin kronik komplikasyonları makroangiopatiler ve mikroangiopatiler olarak 2 ana grupta ele alınmaktadır (Demir 1998).

1.3.3.2.1. Makroangiopatiler

1.3.3.2.1.1. Makrovasküler hastalık

Bu gruptaki en önemli sorun kardiovasküler ve serebrovasküler hastalıklardır. Hipertansiyon, miyokard iskemisi ve enfarktı, geçici iskemik ataklar ve inme ile periferik vasküler hastalık bunların arasında sayılabilir. Diyabetiklerde arteroskleroz'un ve vasküler tromboz'un patogenezi diyabetik olmayan kişilerle benzerdir sadece süreç diyabetiklerde çok daha hızlıdır (Carpenter 2002). Arteroskleroz'un yüksek riski nedeniyle, vasküler hastalık için olağan risk faktörleri agresif olarak tedavi edilmelidir. Diyabetiklere sigarayı bırakmaları önerilmeli ve hipertansiyon mevcutsa dikkatle tedavi edilmelidir. Diyabetiklerde sık görülen hiperlipidemi düşürülmelidir (Andreoli ve ark 1993). Sıkı glikoz kontrolü sağlamak için yoğun insülin terapisinin uygulandığı çalışmalar kardiovasküler hastalıklarda düzelmeler göstermiştir (Carpenter 2002).

1.3.3.2.2. Mikroangiopatiler

Diyabetin mikroangiopatik komplikasyonları 'Diyabetik Triopati' adıyla anılır ve bu gruptaki patolojiler; retinopati, nefropati ve nöropatidir (Demir 1998).

1.3.3.2.2.1. Retinopati

Diyabete ilişkin patolojiler gözün sklera tabakası dışında tüm katmanlarını tutar ve diyabetik retinopati edinsel görme kaybının birinci nedenidir. Diyabetik retinopati görme bozukluklarından, katarakt ve körlüğe kadar uzanabilen geniş bir yelpazede incelenir ve

retinopati proliferatif ve nonproliferatif olmak üzere iki grupta ele alınmaktadır (Demir 1998). Nonproliferatif retinopati; sert, mumsu eksüdalar, yumuşak eksüdalar ve retinal hemoraji ile karakterizedir. Çok yaygın olup sıklığı diyabet süresine bağlı olarak yükselir. Genellikle görmeyi etkilemez ve stabil seyreder. On yıllık diyabetlilerde % 50, 20 yıllık diyabetlilerde yaklaşık % 90 oranında non-proliferatif retinopati mevcuttur. Proliferatif retinopati; neovaskülarizasyon (yeni damar oluşumu) ile karakterizedir, vitröz retina dekolmanına ve sonuçta ağır görme kaybı ile körlüğe sebep olur. Başlıca tedavisi laser fotokoagülasyonu ile mümkün olup görme kaybını önemli derecede düzeltmektedir (Andreoli ve ark 1993).

1.3.3.2.2.2. Nefropati

Diyabetik nefropati tip 1 diyabetiklerde hastalığın başlamasından 15-20 yıl sonra yaklaşık olarak % 50 oranında görülmektedir. Tip II diyabetiklerde ise nefropati daha seyrek görülür (Andreoli ve ark 1993). Diyabetik nefropati Kimmenstill Willson sendromu olarak da bilinir ve erken belirtisi mikroalbuminüri'dir (Demir 1998). Başlangıçta tüm hastalarda glomeruler filtrasyon hızı ve renal kan akımı hiçbir histolojik değişiklik olmaksızın artar. Bu tablo; glomeruler hipertrofi, renal büyüme, mezangial matriksin genişlemesi ve glomeruler bazal membranın kalınlaşması şeklinde ilerler ve glomerulosikleroz ile sonuçlanır (Carpenter 2002). Başlangıçta proteinüri intermittan vasıflıdır. Daha sonra kalıcı şekle döner. Nefrotik sendrom vakaların hepsinde görülmez. Zamanla glomerül filtratın azalmasına, hipertansiyon da eklenerek komplikasyon üremi (böbrek yetmezliği) ile sonuçlanır (Öbek 1990).

1.3.3.2.2.3. Nöropati

Periferik ve otonom nöropati olmak üzere iki şekilde görülür. Periferik nöropati alt ekstremiteleri tutar. En yaygın belirtileri; ekstremitelerde his kaybı, uyuşma, karıncalanma, batma ve yanma hissi, duyu kayıpları ile kas kuvvetsizliğidir (Demir 1998). İleri vakalarda ağrı duyusu kaybı basınç bölgelerinde kronik ülserlerin gelişmesine yol açar (Hough ve ark 2001). Otonom nöropatinin belirti ve bulgularından en belirgin olanları; postural hipotansiyon, kardiovasküler cevapta azalma, gastroparezi (Candan 2003), bulantı, kusma, konstipasyon, üriner retansiyon, inkontinans, aşırı terleme ve erkeklerde impotanstır (Demir 1998).

1.3.4. Diyabet Tedavisi

Bütün diyabet hastalarında tedavinin başlangıçtaki amacı hiperglisemi sonucu gelişen semptomların giderilmesidir. Tedavinin ikinci amacı ise uzun süreli komplikasyonların önlenmesidir. Tip 1 diyabetiklerde insülin tedavisi gereklidir. Bununla birlikte, insüline bağımlı diyabette diyet tedavinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Tip 1 diyabette öğünlerin zamanlaması ve kalori içeriği önemlidir ayrıca diyetin vasküler hastalık riskini azaltıcı nitelikte olması gerekir. Orta ve uzun etkili insülin tedavisi ile öğünlerin zamanlaması insülin eksikliğine göre düzenlenmelidir. Öğünlerde gecikme ya da atlama olursa veya öğün az miktarda ise hipoglisemi riski artar. Bunun tersine; öğünler çok fazla miktarda olursa hiperglisemi meydana gelir. Öğünlerin zamanlaması ve içeriği sabit tutulabilirse hastanın hayat tarzına uyarak insülin dozunu ayarlamak mümkün olabilir. Vasküler hastalık riskini azaltmak için, bütün hastaların doymuş yağ ve kolesterol içeriği düşük diyet alması gerekir. Diyetle lifli besin miktarının yüksek olması, karbonhidrat emilimini azaltarak serum lipid düzeyini düşürmektedir. Bu nedenle, diyetteki lifli besin miktarının artırılması önerilmelidir (Andreoli ve ark 1993).

Tedavide kullanılmakta olan insülinler; etki süresi, saflık derecesi ve kaynakları bakımından farklılık göstermektedir. İnsülin'in azami etkisi ve etki süresi, hastadan hastaya değişmektedir. Hatta aynı hastada insülinin subkutan emilimi, enjeksiyon yerine göre değiştiği gibi, günden güne de farklılık gösterebilir. Bu sebeple, her bir hasta için insülin rejimi düzenlemek daha doğru bir yoldur. Uygulanan insülinin tipi, dozu ve zamanlaması önceden düşünülen ideallere göre değil, hastanın yanıtına göre olmalıdır. Ayrıca bir hasta için düzenlenen insülin uygulaması sabit olmayıp, zamanla tekrar düzenlenmesi gerekir. Fiziksel aktivitedeki değişiklikler, gelişme durumu, öğün içeriği, kullanılan diğer ilaçlar, araya giren bir hastalık ve stres insülin uygulamasında değişiklik yapılmasına sebep olabilir (Yasavul 2004, Andreoli ve ark 1993).

İnsüline bağımlı olmayan diyabetiklerde diyet tedavisi çok önemlidir. Eğer diyet ile kan şekeri düzeyi ayarlanamazsa, oral hipoglisemik ilaçlar veya insülin kullanılması gerekir. Tip 2 diyabet hastalarının çoğu obez olduğu için, diyet tedavisinin başlıca amacı hastayı zayıflatmaktır. Kalori kısıtlaması, genellikle hipergliseminin önemli derece düzelmesine yardımcı olur. Kan şekeri düzeyindeki bu düşme, hastada daha kilo kaybı olmadan görülmektedir. Kilo verme girişiminde bulunanlarda egzersiz sıklıkla yarar sağlar

ve bu nedenle eğer hastanın ileri evre koroner arter hastalığı bulunmuyorsa, şiddetle önerilmelidir. Tip 2 diyabetli zayıf olgularda, kalori kısıtlanmamalıdır. İnsüline bağımlı olmayan bütün diyabetlilerde, doymuş yağ ve kolesterol alımı kısıtlanmalıdır. Tip 2 diyabetli olan hastaların çoğunluğunda, sadece diyetle iyi bir metabolik kontrol sağlanamamaktadır. Böyle hastalarda, diyetle birlikte oral hipoglisemik ilacın kullanılması gerekmektedir. Tip 2 diyabetli hastaların bir kısmında insülin tedavisi gerekmektedir. Bu hastalarda yalnızca insülin direnci olduğu için, sıklıkla daha yüksek insülin dozuna gerek vardır (Andreoli ve ark 1993).

1.3.5. Deneysel Diyabet Modelleri

Günümüze kadar tanımlanmış birçok hayvan diyabet modeli bulunmakla birlikte, bu modellerden hiçbirisi insan diyabetine tam olarak eşdeğer tutulamaz (Pickup ve Williams 2002). Tip 1 diyabet modelleri; kimyasal olarak oluşturulan tip-1 diyabet modelleri (Alloksan, streptozotosin), spontan tip-1 diyabet modelleri (Bio-Breeding rat, NOD fare, Macaca nigra maymunu, Keeshand köpeği, Çin hamsteri, Yeni Zelanda beyaz tavşanı, Komodo Diabetes Prone rat), virüsle oluşturulan modeller, transgenik tip 1 diyabet modelleri olarak gruplandırılabilir. Tip 2 diyabet modelleri ise; ağır düzeyde hiperglisemili modeller (db/db fare, Rhesus maymunu), ılımlı hiperglisemili modeller (ob/ob fare), deneysel modeller (pankreatektomi, hipotalamik lezyon) ve diyet ile oluşturulan modeller (yüksek yağlı ve şekerli diyetle beslenme) olarak sayılabilir (İrer ve Alper 2004).

1.3.6. Diabetes Mellitus ve Dişi Genital Sistem

Diabetes mellitus, yalnız kan şekeri yüksekliği ile seyretmeyip, özel komplikasyonlara yol açan bir hastalıktır (Öbek 1990). Yapılan çeşitli çalışmalarda; diyabete bağlı östrojen (Cox ve ark 1994), progesteron (Tesone ve ark 1983), LH ve FSH düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Bestetti ve ark 1987). Yüksek glikoz düzeyinin rat granüloza hücrelerinde östrojen ve progesteron düzeyini azalttığı (Chabrolle ve ark 2008), serum ve foliküllerdeki insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) düzeyinin diyabetik grupta daha düşük olduğu ve folikül sıvısındaki östrojen oranının diyabete bağlı olarak azaldığı ortaya konmuştur. Bunların aksine; serum östrojen ve FSH düzeylerinin diyabet ve kontrol gruplarında benzer olduğu, glisemik durumun folikül sıvısındaki progesteron konsantrasyonunu etkilemediği (Meurer ve ark 1991), serum FSH, LH,

östrojen ve total testosteron düzeyinin diyabette daha yüksek olduğu ve insüline bağımlı olmayan diyabetli kadınların biyokimyasal ve klinik olarak hiperadrogenizm'e sahip oldukları da ifade edilmiştir (Tok ve ark 2004).

Diyabetin ovaryum üzerine etkileri incelendiğinde; ovaryum ağırlığının azaldığı (Tesone ve ark 1983), atretik folikül oranının daha yüksek olduğu (Meurer e ark 1991, Cox ve ark 1994), primer ve sekonder foliküllerde folikül sayılarının azaldığı (Garris 1984), foliküler çapın daha küçük olduğu tespit edilmiştir (Cox ve ark 1994). Fare ovaryumlarının kesitlerinde diyabete bağlı oosit gelişiminde gecikmenin olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada; anneksin V, Bax ve kaspaz-3 eksprese eden oosit miktarında yükselme saptanmış olup, diyabetin oositte apoptosis'ı arttırdığı dile getirilmiştir (Lin ve ark 2010). Diyabetli kadınlarda polikistik over sendromu prevalansının daha yüksek, hirsutizm'in daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir (Tok ve ark 2004). Diyabetin etkisiyle ikinci kutup cisimcikleri bulunan oositlerin yüzdesinin daha düşük olduğu (Rehák ve ark 1996), dejenere olmuş oosit sayısının ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Veselá ve ark 1995). Diyabetin ovulasyon oranını azalttığı, oositteki mayotik iğ defektlerini ve anöploidi'yi arttırdığı vurgulanmıştır (Cheng ve ark 2011). Diyabetik NOD (Non-Obese Diabetic) farelerde ovaryum granüloza hücrelerinde ve atretik foliküllerde yüksek konsantrasyonda lipid damlacıklarının bulunduğu, ovaryum stroma hücrelerinde atrofi oluşumu ve lipid kaybının olduğu saptanmış olup bu yapısal değişikliklerin, oosit olgunlaşması ile ilgili bozukluklarla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Tatewaki ve ark 1989). Diyabet tablosunda kumulusla çevrili oositlerde konneksin ekspresyonunun ve gap junction iletişiminin azaldığı, bu durumun bozulmuş oosit mayotik olgunlaşması ve zayıf gebelik sonucundan sorumlu olabileceği ifade edilmiştir (Ratchford ve ark 2008). Hem akut hemde kronik diyabet modellerinde, daha küçük ve daha az gelişmiş foliküllerin bulunduğu, kumulusla çevrili oositlerde konneksin-43 ekspresyonunun daha düşük olduğu, bu sebeple hiperglisemi ve hipoinsülineminin oosit olgunlaşması üzerine zararlı etkiye sahip olabileceği vurgulanmıştır (Chang ve ark 2005). Ayrıca diyabetik farelerde ovaryum disfonksiyonlarının foliküler atrofi, adipozite, bozulmuş steroidogenesis ve glikoz kullanımındaki dengesizlik ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Garris ve ark 1985).

Diyabetin tuba uterina, uterus ve vajina üzerine etkileri incelendiğinde; diyabet grubundaki ratların ovaryum, uterus ve vajina kütlelerinin değiştiği, uterus endometriyum

yüksekliği ile vajina epitelinin kalınlığının azaldığı saptanmıştır (Ivanova ve ark 1977). Ayrıca diyabete bağlı azalmış hücre proliferasyonuna paralel olarak uterus miyometrial kas tabakasında daralmanın meydana geldiği tespit edilmiştir (Favaro ve ark 2010). Diyabetik NOD farelerde uterusda ağırlık kaybı, luminal ve glandular epitelde lipid birikimi, endometriyal ve miyometriyal atrofi ile kas hücre katmanlarının sayısının azaldığı bildirilmiş olup uterustaki bu değişikliklerin implantasyon ve canlı embriyo oranının azalması ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Tatewaki ve ark 1989). Ketonürik ve diyabetik hamsterlarda kontrole kıyasla uterus epitelinin mikrovillus ve sekresyon aktivitesinden yoksun olduğu, epitel yüksekliğinin azaldığı, epitel altındaki bazal laminanın daha ince olduğu, endometriyal stromanın bozulduğu ve stromal kan damarlarının bazal laminasının daha ince olduğu belirlenmiştir (Garris ve Smith 1983). Diyabetik ratlarda insülin eksikliğine bağlı olarak uterusda hücre bölünme oranının öglisemik ratlara göre azaldığı, insülin tedavisinin ise luminal hücre bölünme düzeyini restore ettiği ifade edilmiştir (Kirkland ve ark 1981). Alloksan ile diyabet oluşturulan ve gebe olmayan dişi tavşanların üreme sistemindeki kapillar damarların ince yapılı oldukları fakat bazal membranlarında yaygın bir kalınlaşma gözlemlendiği ifade edilmiş olup görülen bu vasküler lezyonların üreme sisteminin fonksiyonlarını etkileyebileceği bildirilmiştir (Liebhart ve Szamborski 1974). Gestasyonel endometriyumun diyabete bağlı immun ve vasküler defektlere sahip olduğu ve bunun muhtemelen fetal kayıp ile doğum defektlerine katkı sağlayabileceği vurgulanmıştır (Burke ve ark 2007). Diyabetin preimplantasyon döneminde fallop tüplerinde ve uterusda insülin benzeri büyüme faktörleri ve reseptörlerinin mRNA ekspresyonlarında değişime yol açtığı ve bunun diyabetik embriyopati ile sonuçlanabileceği ifade edilmiştir (Zakaria ve ark 2007). Diyabete bağlı vajinal submukozadaki kollagen bağ dokunun yoğun, düzensiz ve biçimsiz yerleştiği, vaskülaritenin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca transforming büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ekspresyonunun kollagen bağ dokuda, fibroblastlarda ve düz kas liflerinde göze çarptığı, kontrol grubunda ise TGF- $\beta 1$ ekspresyonunun gözlenmediği bu nedenle diyabetin TGF- $\beta 1$ yoluyla vajinal doku fibrozis'ini uyurabileceği vurgulanmıştır (Park ve ark 2001). Benzer olarak diyabetin vajinal dokuda kollagen, TGF- $\beta 1$ ve plazminojen aktivatör inhibitör ekspresyonu ile apoptozisi arttırdığı, α -düz kas aktin ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiş ve bu kanıtlara dayanılarak diyabetin vajinal fibrozis ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ferrini ve ark 2006). Diyabete bağlı vajinal muskularis alanda daralma, elastik ipliklerde

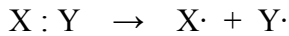
belirgin bir kısılma ve nitrejik immunreaktif sinir liflerinde önemli bir azalma saptanmış olup diyabetin vajinal yapıyı bozduğu ifade edilmiştir (Cushman ve ark 2009a). Diyabet tablosu nedeniyle vajinal östrojen, progesteron ve androjen reseptör ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı ve böylelikle steroid reseptör sinyalizasyonunun dağılımındaki bozulmaların vajinal fonksiyonları olumsuz etkileyeceği vurgulanmıştır (Cushman ve ark 2009b). Vajinal düz kasların işlevlerinin adrenerjik, kolinerjik ve NANC (non-adrenergic, non-cholinergic) nörotransmitter mekanizmalarla düzenlendiği ve diyabetin bu mekanizmaları bozduğu ifade edilmiş böylelikle nörotransmisyondaki diyabetle ilişkili değişikliklerin seksüel uyarım esnasında yetersiz fizyolojik yanıt ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Giraldi ve ark 2001). Benzer olarak diyabetin vajinal doku yapısı ve hücre gelişimi ile düz kas kasılmasını düzenleyen anahtar enzimlerde dramatik değişikliklere neden olabileceği, nihayetinde seksüel uyarım esnasında genital cevabın etkilenebileceği belirtilmiştir (Kim ve ark 2006a).

1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

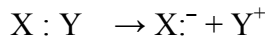
Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denilmektedir (Çavdar ve ark 1997).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

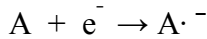
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (Akkuş 1995). Hem organik ve hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik taşırlar (Kavas 1989). Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş

metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş 1995). Canlının içinde serbest radikal oluşumu endojen olarak normal metabolik reaksiyonlardan ya da eksojen olarak sigara dumanı ve hava kirleticileri, bazı çözücüler, ilaçlar, pestisidler ve radyasyona maruz kalma gibi durumlardan kaynaklanabilir (Machlin ve Bendich 1987).

Reaktif nitrojen türleri (RNS) ile birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen serbest oksijen radikalleri, hem yaralı hemde zararlı olmak üzere çift yönlü rol oynayan maddeler olarak bilinmektedirler. Nitrik oksit sentaz ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) oksidaz isoformları gibi sıkıca tanzim edilmiş enzimler tarafından üretilir. Reaktif oksijen türlerinin mitokondrial elektron transfer zinciri ya da NADPH'nin sürekli uyarılmasından kaynaklanarak aşırı üretimi oksidatif stresle sonuçlanır (Valko ve ark 2007). Yüksek reaktif moleküller hücrel membranlarda çokludoymamış yağ asitleri ile DNA'da nükeotidlerle ve proteinlerde sülfidril bağlarıyla reaksiyona girerek doku hasarına yol açabilirler (Machlin ve Bendich 1987). Reaktif oksijen türlerinin üretimindeki aşırı ve devamlı artışın; kanser, diyabet, arterioskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, iskemi/perfüzyon hasarı, obstrüktif uyku apnesi ve yaşlılık süreci gibi çeşitli hastalıkların ve bozuklukların patogenezinde yer aldığı ifade edilmektedir (Dröge 2002). Oksidatif stres normal hücrelere kıyasla çeşitli kanser hücrelerinde mevcut olan hücrel redoks dzensizliğini uyarır ve bu durum da onkojenik stimölasyonla ilişkilidir. DNA mutasyonu karsinogeneziste kritik bir aşamadır ve bazı tümörlerde oksidatif DNA lezyonlarının düzeyinin yükseldiği bildirilmiştir (Valko ve ark 2006). Bunun aksine; ROS ve RNS düşük konsantrasyonlarda enfeksiyon ajanlarına karşı defans, hücrel sinyal yollarının fonksiyonun sürdürölmesi ve mitojenik cevabın iletilmesinde yaralı etkilere sahiptir (Valko ve ark 2007).

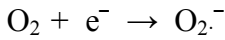
İlginçtir ki; çeşitli ROS ile ilişkili işlevler, hücreleri ROS ile ilişkili oksidatif strese karşı korur ve redox balansının tekrar kurulmasını ve sürdürölmesini sağlar. Reaktif oksijen türlerinin açıkça ikiyüzlü bir karakter olduğu ispatlanmıştır. Örneğin; ROS hücre içinde, kanser hücrelerinin onkojenik fenotiplerinin sürdürölmesi ve indüklenmesini sağlayan hücreiçi sinyal kaskadlarında ikincil mesajcı olarak davranırken, hücrel yaşlılığı ve apoptozisi uyarak anti-tümörjenik bir fonksiyon yürütür (Valko ve ark 2007).

Artan oksidatif stres; reaktif oksijen radikalleri öncülerinin aşırı üretimi ve/veya engelleyici ve tutucu sistemlerin düşük verimlilik göstermesinden kaynaklanabilir. Serbest radikal üretiminde artışa yol açılarak hücre ölümü, doku hasarı ve metabolik stresin otokatalitik döngüsü yükseltilebilir böylece baskılayıcı ve önleyici mekanizmalar riske atılarak oksidatif stres daha da alevlenebilir. Biyolojik sistemlerde; oksidan üretiminin oranı ve reaktif oksijen türlerinin kararlı hal seviyeleri kolaylıkla ölçülemez. Bu sebeple; oksidatif hasar ölçümleri oluşumun kinetikleri, kararlı durum seviyeleri ya da dokularda plazma ve idrardaki antioksidanların birikim ölçüsünden tahmin edilerek anlaşılmaktadır (Baynes 1991).

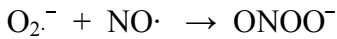
1.4.1. Reaktif Oksijen Türleri

1.4.1.1. Süperoksit radikali

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir.



Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit'in fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

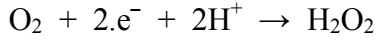


Böylece NO 'ın normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca peroksinitrit'in doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır. Süperoksit düşük pH değerlerinde daha reaktiftir. Ayrıca hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir (Akkuş 1995).

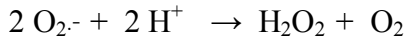
1.4.1.2. Hidrojen peroksit radikali

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksit'in bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksit'i (H_2O_2) meydana getirir. Hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (Akkuş 1995). Hidrojen peroksit'in önemli ölçüde hücre ölümünü indüklediği ve hücre içi ROS düzeyini, lipid peroksidasyonu ve DNA fragmentasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Kim ve ark 2013). Bu

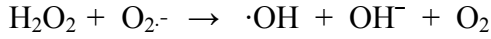
serbest radikal antioksidan enzimler tarafından detoksife edilir (MacMillan-Crow ve Crow 2011).



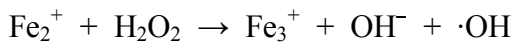
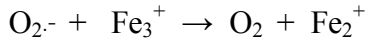
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit'in üretimi süperoksit'in dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

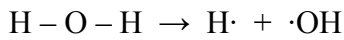


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Bu reaksiyon katalizörlü ya da katalizörsüz olarak oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce feri demir (Fe_3^+) indirgenir. Sonra ferro demir kullanılarak 'Fenton reaksiyonu' ile hidrojen peroksit'ten $\cdot OH$ ve OH^- üretilir (Akkuş 1995).



1.4.1.3. Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ($\cdot OH$), hidrojen peroksit'in geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (Akkuş 1995).



Oksidatif strese en olası toksik reaktan olarak görülmektedir. Aşırı derece reaktif olup çok hızlı bir şekilde hem yüksek hem de düşük molekül ağırlıktaki bileşikler hasara

uğratabilir veya değiştirebilir (Erener ve ark 1992). Ayrıca tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (Akkuş 1995).

1.4.1.4. Singlet oksijen

Singlet oksijen (1O_2), ortaklaşmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere 2 şekli vardır. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar. Singlet oksijenin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir (Akkuş 1995). Singlet oksijen heme proteinleri, lipoksijenazlar, aktive lökositler ve radikal sonlandırma reaksiyonlarının aracılık ettiği süreçleri ihtiva eden enzimatik ve enzimatik olmayan bir dizi reaksiyon tarafından oluşturulabilir (Davies 2003). Singlet oksijen genotoksik ve sitotoksik etkiler sarfederek biyomoleküller üzerinde zararlı etkiler oluşturur. Bunun yanında; çeşitli proteinlerin ekspresyonlarının indüklenmesine yol açan hücresel sinyal olayları üzerine de belirgin etkileri olduğu öne sürülmektedir (Briyiba ve ark 1997).

1.4.1.5. Hipokloröz asit

Hipokloröz asit, nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir oksidandır. Miyeloperoksidaz enzimi; hipokloröz asit'in hidrojen peroksit ve klorid'ten üretimini katalize eder (Winterbourn ve Kettle 2000). Bu bileşik önemli bir antibakteriyel ajandır. Fakat aşırı ya da yanlış yerde üretimi ateroskleroz, artrit ve bazı kanser türleri gibi çok sayıda hastalığın oluşumuna katkı sunabilir (Pattison ve Davies 2001). Hipokloröz asit DNA bazlarının klorlanmasına ve proteinlerde tirozin kalıntılarına yol açabilir ayrıca membran proteinlerine zarar vererek membranlardan geçebilir. Bunların yanında; proteolitik enzimlerin baskılanmasında önemli olan alfa 1-antiproteinaz'ı ayrıca endotel hücrelerinin membranında bir glikoprotein olan ve kan pıhtılaşmasının düzenlenmesinde rol oynayan trombomodulin'i inaktive edebilir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

1.4.2. Reaktif Nitrojen Türleri

1.4.2.1. Nitrik oksit (NO)

Nitrik oksit; gaz halinde bir serbest radikal olup, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin önemli bir aracısıdır (Knight 1999). Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz enzimi vasıtasıyla L-argininden sentezlenir (Atmaca 2001). NO, ya konstitutif (esas) ve kalsiyuma bağımlı ya da indüklenebilir ve kalsiyumdan bağımsız olarak meydana gelir (Türköz ve Özerol 1997). Nitrik oksit sentaz enziminin iki yapıcı/esas bir de indüklenebilir olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır (nNOS, iNOS, eNOS). Bu enzimler aynı hücrelerde eksprese olmazlar. Yapıcı enzimlerin bir tanesi endotelde, diğeri ise merkezi ve perifer sinirlerde, iskelet kaslarında, pankreas β hücrelerine, bronşiyol epitel hücrelerinde, uterus ve mide de bulunur. Bütün izoformlar, L-arginin'in sitrulin ve nitrik oksit'e dönüşümünü katalize eder (Knight 1999). Nitrik oksit vasküler endotelyum, nöronlar ve immün hücreler gibi birçok dokuda üretilir (Atmaca 2001).

Nitrik oksit (NO), kalp damar sistemi homeostazisinin düzenlenmesinde etkili en önemli aracı moleküllerden biri olarak bilinmektedir (Bülbül ve Soylu 2008). Hücre zarından geçer ve kan akımı ile trombozun modülasyonunda hücre içi mesajcı olarak görev yapar. Bununla birlikte; endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarakla tanınır ve vasküler düz kas gevşemesi için önemli bir sinyal rolü vardır (Knight 1999). Nitrik oksit'in kalp damar sistemi üzerine; damar genişlemesi, trombosit agregasyonunun önlenmesi, damar yaralanmalarını takiben damar düz kas hücrelerinin çoğalmalarının engellenmesi, kalp kası kasılımının kontrol edilmesi (Bülbül ve Soylu 2008) ve nötrofil infiltrasyonunun inhibe edilmesi gibi birçok fizyopatolojik etkileri bulunmaktadır (Atmaca 2001). Ayrıca sinir sisteminde de fizyolojik ve patolojik rolleri vardır. Sinir sistemi morfogenezinde ve sinapsların şekillenmesinde rol oynar, nörotransmitter salınımını ve gen ekspresyonunu düzenleyebilir (Türköz ve Özerol 1997).

Endojen olarak üretilen NO; immünitinin düzenlenmesi (Türköz ve Özerol 1997) ve malign hücrelerin yıkımını içine alan antimikrobiyal aktiviteye de sahiptir. iNOS, immünolojik ve inflamatuvar uyarım sonrası makrofaj, nötrofil, mast hücresi, endotel ve vasküler düz kas hücreleri gibi çok sayıda hücrede eksprese olur. Bu sebeple; nitrik oksit immün hücreleri aktive eder ve öldürücü bir molekül gibi davranır. Nitrik oksit'in direk

toksitesitesi ılımlı olmasına rağmen, süperoksit ile tepkimeye girdiği zaman güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluşur böylece toksitesitesi büyük ölçüde artar. Peroksinitrit'in çeşitli nörodejeneratif, bazı böbrek ve romatoid artrit gibi hastalıklarda rolü olabileceği gösterilmiştir (Knight 1999).

1.4.3. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküller serbest radikaller tarafından etkilenirler fakat lipidler en hassas olanlarıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Çünkü hücresel lipid çift katmanı lipid peroksidasyonuna yüksek oranda duyarlıdır. Bu süreç hücrenin ölümüne yol açabilir (Knight 1999).

Organizmada oluşan serbest radikal etkisi sonucu, membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılır. Böylece yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağlarının pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Plazma ve organel lipid peroksidasyonu metallerin varlığında artar. Bu metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksit ile hidrojen peroksit'in daha güçlü oksidantlara dönüşümünü katalizlerler. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asit ile ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir (Akkuş 1995).

Malondialdehid, serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipid peroksidasyonunun son ürünlerindendir (Süleyman ve ark 2001). Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır (Akkuş 1995).

Lipid peroksidasyonunun temel mekanizması, oluşan toksik aldehidlerin proteinler ve protein yapısında olmayan yapılarla etkileşmesi ve hücre zarlarına yönelik istenmeyen etkiler meydana getirmesidir (Yarsan 1998). Direkt olarak yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verirler. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir (Akkuş 1995).

Yapılan çeşitli çalışmalarda; tip 2 diyabet hastalarında serum MDA düzeylerinin önemli ölçüde yüksek olduğu (Kumawat ve ark 2013, Bhatia ve ark 2003) ve artmış lipid peroksidasyonunun yüksek glikoz seviyeleri ile yakın bir ilişkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bandeira Sde ve ark 2012). Bununla birlikte; diyabet hastaların eritrositlerinde membran lipid peroksidasyonunun önemli ölçüde arttığı ve eritrositlerdeki membran lipid peroksidasyon hasar düzeyinin glikolize hemoglobin düzeyi ile önemli ölçüde paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Jain ve ark 1989). Ayrıca kastaki lipid peroksidasyonunun insülin direncinin gelişiminde rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Ingram ve ark 2012). Bunların yanında; streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda kan serumunda (Kinalski ve ark 2000) ve uterus endometriyumunda MDA düzeylerinin önemli ölçüde arttığı (Güney 2012), ayrıca iskemi reperfüzyon hasarında ovaryum greftlerinde lipid peroksidasyon ürünlerinin daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (Nugent ve ark 1998).

1.4.4. Antioksidan Sistemler

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar; serbest oksijen radikallerini tutarak, onları çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, onlarla etkileşip bir hidrojen aktarım aktivitesini azaltarak veya inaktif şekle dönüştürerek ya da radikalleri kendilerine

bağlayıp zincirlerini kırarak etki gösterirler. Antioksidanlar; enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde sınıflandırılmaktadır (Akkuş 1995).

1.4.4.1. Enzimatik antioksidanlar

1.4.4.1.1. Süperoksit dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD); enzim peroksit'in hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel bölmelerdeki süperoksit düzeyini kontrol etmede önemli bir rol oynar (Akkuş 1995). SOD1/CuZn-SOD, SOD2/Mn-SOD ve SOD3/EC-SOD olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır (Koyama ve ark 2013). Bu enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Akkuş 1995). Süperoksit dismutaz endojen olarak hücresel savunmada görev alır. Bu sebeple inflamatuvar hastalıkların tedavisi için kullanışlı terapötik bir ajandır. Eksojen SOD ilavesi; nötrofil apoptozisini indükler ve böylelikle SOD'un nötrofil aracılı inflamasyonun baskılayıcı bir mediatörü olarak kullanışlı olabileceği bildirilmektedir (Yasui ve Baba 2006). Bununla birlikte; süperoksit dismutaz fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde rol oynar. Bu yüzden SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Ayrıca lenfositlerde de SOD aktivitesi bulunmaktadır (Akkuş 1995).

1.4.4.1.2. Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz bir selenoenzimdir ve tiyol ko-faktörlü zararlı hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyerek oksidatif stresten organizmanın korunmasında anahtar bir rol oynar (Bhabak ve Mugesh 2010). Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Glutatyon peroksidaz aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Akkuş 1995). Glutatyon peroksidaz-1 (GPx-1) enzimatik olarak hidrojen peroksiti suya indirgeyerek onun zararlı etkilerini sınırlandırır (Kavas 1989). Ayrıca reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği kanser başlangıcının önlenmesini sağlar (Brigelius-Flohé ve Kipp 2009).

1.4.4.1.3. Katalaz

Katalaz dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir (Akkuş 1995). Hidrojen peroksit'in su ve oksijene ayrışımını katalize eder (Zhang ve ark 2010) ayrıca organik hidroperoksitleri çıkarır (Nazıroğlu 2012). Bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (Akkuş 1995). Katalaz memeli hücrelerinin peroksizomlarında mevcut olan bir enzimdir (Scibior ve Cieczot 2006). Hidrojen peroksit'in toksik etkilerine karşı hücreleri korumada kritik roller oynar (Goyal ve Basak 2010). Çeşitli hastalıklar için iyileştirici bir faktör olarak kullanılabilir (Nishikawa ve ark 2009). Katalaz gen mutasyonları diyabet, hipertansiyon ve vitiligo gibi hastalıklarla ilişkilidir (Góth ve ark 2004).

1.4.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

1.4.4.2.1. C vitamini

C vitamini (askorbik asit) kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilen vitaminlerden olan askorbit asit, özellikle yeşil sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaklardan emilir. Isıtılmaya dayanıksızdır, durulanmaya ise dayanıklıdır (Akkuş 1995). C vitamini nötrofil fonksiyonlarında önemlidir ve dolaşımdaki lökositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Knight 1999). Ayrıca C vitamini demir alımında önemli bir regülatördür. Ferrik demiri ferro formuna redükleyerek gastrointestinal sistemden diyet nonhem demir absorpsiyonunu sağlar ve demir bağlı proteinleri stabilize eder. Birçok hayvan glikozdan C vitamini sentezleyebilir fakat insanlar, diğer primatlar, kobay ve yarasalarda C vitamini sentezinde gerekli olan gulonolakton oksidaz enzimi eksik olduğundan diyetlerinde bu vitamine gereksinim gösterirler. Nitekim uzun süreli askorbik asit yokluğu kollajenin post-translasyonel modifikasyonunda defekte neden olup skorbüt'e ve sonunda ölüme yol açabilir. Antiskorbutik etkisine ilaveten C vitamini biyolojik sistemlerde güçlü bir redükleyici ajan ve serbest radikal temizleyicisidir (Hacışevki 2009).

Yapılan çeşitli çalışmalarda; C vitamininin kadmiyuma maruz kalan rat testisinde oksidatif stresi önlediği ve steroid üretiminde hayati roller oynadığı tespit edilmiştir (Sen Gupta ve ark 2004). Gökkuşluğu alabalıklarında C vitamini eksikliğinin hem sperm

konsantrasyonunu hem de motilitesini azalttığı bu sebeple C vitamininin erkek balık üremesinde önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Ciereszko ve Dabrowski 1995). Ovaryumun iskemi perfüzyon hasarının azaltılmasında etkili olduğu belirlenmiştir (Sağsöz ve ark 2002). Konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda C vitamini takviyesinin in vivo endotel hücre apoptozisini baskıladığı böylelikle C vitamininin endotelial fonksiyonlarda yararlarının olduğu saptanmıştır (Rössig ve ark 2001). Sigara içenlerde koroner mikrosirkulatuar cevapsızlığı ve bozulmuş koroner akımı restore ettiği bildirilmiştir (Kaufmann ve ark 2000). Ayrıca L-askorbik asit'in akut myeloid lösemi hücrelerinde apoptozisi indüklediği (Park ve ark 2004) ve yüksek doz intravenöz C vitamini tedavisinin kanser hastalarında inflamasyonu azaltabileceği vurgulanmıştır (Mikirova ve ark 2012). Bunların yanında; streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda C vitamininin gastrik asit salgılanmasının düzeltilmesinde yararlı olduğu ve ülserasyona karşı koruyucu olduğu ifade edilmiştir (Owu ve ark 2012). Diğer taraftan; tip 1 diyabetli adölesanlarda akut hiperglisemik etkiyi ve endotel fonksiyonlarındaki bozulmayı bloke ettiği belirlenmiştir (Hoffman ve ark 2012).

1.4.4.2.2. E vitamini

Yağda eriyen bir vitamindir. En çok pamuk yağı ve keten toğumunda bulunmaktadır. En önemli görevi öncelikle antioksidan etkiye sahip olmasıdır (Mammadov 2002). E vitamini; kritik sülfat grupları ile ansatüre fosfolipidlerin oksidasyonuna aracılık eden reaktif oksijen ve serbest radikallerin yan etkilerine karşı vücudun hücre içi savunmasının bir parçasıdır. E vitamininin oksidasyonu ile hücre içinde diğer lipid materyallerinin serbest radikallere ve peroksitlere oksidasyonunu önlenir. Ayrıca bir zincir kırma antioksidanı olarak çalışıp, serbest radikalleri nötralize eder ve membranlarda lipidlerin oksidasyonunu önler (Mcdowell 2000). Yapılan çeşitli çalışmalarda; E vitamininin eritroid öncülerinin koloni oluşturma sayısını arttırdığı, eritropoez'i yükselttiği ve kan hemoglobin düzeyini geliştirdiği tespit edilmiştir (Jilani ve Iqbal 2011). Ayrıca humoral immunitiyi etkileyerek B lenfositleri uyarır ve Ig sentez hızını artırır (Mammadov 2002). Bunların yanında; oksidatif stres yoluyla testis'in yapı ve fonksiyonlarını bozan formaldehid maruziyetine karşı E vitamininin bir ölçüde bu hasarı reserve ettiği bildirilmiştir (Zhou ve ark 2006). Ayrıca testiste alfatoksin ile oluşturulan lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde düzelttiği (Verma ve Nair 2001) ve 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)'nin testiste meydana getirdiği oksidatif strese karşı önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Latchoumycandane ve Mathur 2002). Ovaryumda iskemi perfüzyon hasarını azaltarak foliküllerin hayatta kalma oranını arttırdığı (Nugent ve ark 1998) ve telomeraz aktivitesini baskılayarak yumurtalık kanser gelişimine karşı önemli bir koruyucu ajan olabileceği vurgulanmıştır (Bermudez ve ark 2007). Bunların yanında; vitamin E'nin alloksan ile diyabet oluşturulan farelerde kandaki insülin konsantrasyonunun azalmasını önleyebileceği ifade edilmiştir (Kamimura ve ark 2013). Diyabetik komplikasyonların geciktirilmesinde ve yanı sıra komplikasyonların ilerlemesinin yavaşlatılmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Jain ve Jain 2012). Ayrıca tip 1 diyabet hastalarında oksidatif stresi düzelttiği ve antioksidan savunma sistemini geliştirdiği tespit edilmiştir (Gupta ve ark 2011). Diğer taraftan; rat akciğerinde diyabetle oluşan patolojik değişikliklere karşı koruyucu etkisi olduğu ifade edilmiştir (Alireza ve ark 2013).

1.4.4.2.3. Karotenoidler

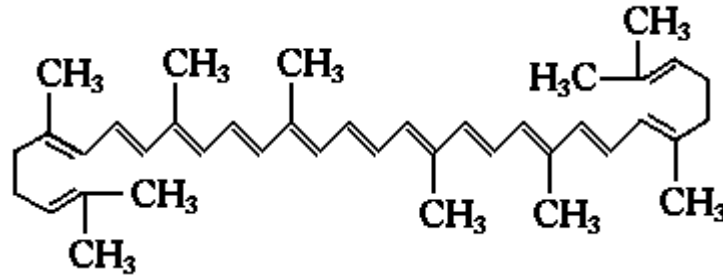
Karotenoidler bitkilerde bulunan, açık sarı-kırmızı arası renkleri veren pigmentlerdir. Meyve sebze tüketimi sonucu vücuda alınırlar (Ötleş ve Atlı 1997). Yağda çözünürler (Riccioni 2009), suda ise çözünmezler (Ötleş ve Atlı 1997). Karaciğerde ya da yağ dokuda depolanırlar (Agarwal ve ark 2012). Bazı karotenoidler A vitamini ön maddesi olarak aktivite gösterirler ve bu nedenle vücut için gerekli olan A vitamininin sentezi açısından önemlidirler (Ötleş ve Atlı 1997).

Karotenoidler; biyolojik membranlarla etkileşimleri ve kimyasal yapıları nedeniyle antioksidan özelliğe sahiptirler (Riccioni 2009). Fotosentetik organizmalarda singlet oksijenin söndürülmesi yoluyla çok önemli koruyucu bir rol oynarlar (Ramel ve ark 2013). Diyetteki en bol karotenoidler; beta-karoten, likopen, lutein, beta-kriptoksatin, zeaksatin ve astaksatin'dir (Riccioni 2009).

1.4.4.2.3.1. Likopen

Likopen; kırmızı renkli karotenoid bir pigmenttir (Hekimoğlu 2010). Karotenoid ailesinde yer almasına rağmen pro-vitamin A aktivitesine sahip değildir (Mordente ve ark 2011). Gıda işleme sürecinde yıkılmaz (Bánhegyi 2005). Likopen; domates salçası, domates ketçapı, pizza sosu, domates suyu, karpuz, domates sosu, pembe guava, papaya,

taze domates ve pembe greyfurt gibi gıdalarda bulunmaktadır (Bramley 2000). Bu fitokimyasal insan vücudunda en yaygın bulunan güçlü karotenoid antioksidanlardan biridir (Hekimoğlu 2010). Reaktif oksijen türleri ve serbest radikal temizlenmesinde oldukça etkilidir. Hücre siklusunu kontrol eder ve faz II detoksifikasyon enzimlerini aktive eder (Belter ve ark 2011). Enzim aktivitelerini ve cevaplarını etkileyerek redoks hassas moleküler hedefleri kontrol edebilir (Palozza ve ark 2012). Reaktif oksijen radikallerini süpürerek lipid peroksidasyonu ve DNA hasarını önlemede etkilidir (Kelkel ve ark 2011).



Şekil 1.1. Likopen'in yapısı (Bramley 2000)

Yapılan çeşitli çalışmalarda; likopen'in sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisite ve oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Atessahin ve ark 2005). Siklosporin A ile indüklenen oksidatif stresin rat testisinde ve sperm kalitesinde meydana getirdiği yapısal ve fonksiyonel zararlara karşı potansiyel bir koruyucu rolü olduğu saptanmıştır (Türk ve ark 2007). Ayrıca deneysel katarakt gelişimine karşı koruyucu ya da terapi amaçlı kullanılabileceği ifade edilmiştir (Gupta ve ark 2003). Bunların yanında; okratoksin A ile oluşturulan DNA hasarından karaciğer ve böbrek dokularını koruyabileceği belirlenmiştir (Aydın ve ark 2013). Demir ile indüklenen oksidatif stres, proliferasyon ve otofajiyi hem biyokimyasal hemde histolojik olarak önlediği tespit edilmiştir (Liu ve ark 2013). Total antioksidan kapasiteyi arttırıp, MDA-LDL oluşumunu baskılayarak T hücre bağımlı adaptif immün cevabı hafiflettiği saptanmıştır (Neyestani ve ark 2007). Diğer taraftan; erkeklerde iskemik felç riskini azalttığı (Karppi ve ark 2012) ve kemoterapinin yan etkilerini önleyebileceği ya da azaltabileceği bildirilmiştir (Sahin ve ark 2010).

Likopen'in kardiovasküler hastalıklar, kanser ve diabetes mellitus gibi hastalıklarda da kayda değer etkilerinin olduğu ifade edilmiştir. Bu hastalıklarla ilgili çalışmalarda;

likopen'in önemli kalp koruyucu etkisi olduğu, miyokard enfarktüsünün tedavi ve profilaksisinde yardımcı olarak sunulabileceği belirlenmiştir (Ojha ve ark 2013). Ayrıca hipoksi/reoksijenizasyon (H/R) ile indüklenen kardiomyositlerdeki apoptozise karşı korunmada güçlü bir farmakolojik potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır (Yue ve 2012). Bunların yanında; in vitro çalışmalarda normal hücreleri etkilemeksizin kanser hücrelerinde hücre büyümesini durdurup, apoptozisi indükleyebildiği bildirilmiştir. İn vivo çalışmalarda ise; likopen tedavisinin karaciğer, akciğer, meme ve kolon da tümör gelişimini baskıladığı (Trejo-Solís ve ark 2013), kanserleşme aşamasında gap junction iletişimini arttırdığı saptanmıştır (Kelkel ve ark 2011). Benzer olarak; prostat kanser hücrelerinde metastatik kapasiteyi azalttığı, proliferasyonu baskıladığı ve apoptozisi indüklediği belirtilmiştir (Holzapfel ve ark 2013).

Likopen'in alloksan ile diyabet oluşturulan ratlarda kilo kaybını ve hiperglisemiye iyileştirdiği bu durumun da muhtemelen lipid peroksidasyonunu azaltma ve antioksidan kabiliyeti arttırmadaki etkisiyle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Yue ve ark 2006). Diğer taraftan; diyabetle ilişkili komplikasyonlarda önemli bir belirteç olan ACE (Anjiotensin Dönüştürücü Enzim) aktivitesinin baskılanmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Yue ve ark 2012). Bunların yanında; diyabetik ratlarda erektil disfonksiyonları glikoz seviyesini düşürerek, oksidatif stresi azaltarak ve eNOS aktivitesini arttırarak restore ettiği ifade edilmiştir (Gao ve ark 2012). Ayrıca streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda serum glikoz, total kolesterol, triglisert, aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) seviyelerini düşürdüğü, serum insülin seviyesini arttırdığı (Bayramoglu ve ark 2013) ve endotel disfonksiyonlarla ilişkili diyabetik vasküler komplikasyonların önlenmesinde yararlı olabileceği belirtilmiştir (Zhu ve ark 2011). Diğer taraftan; diyabetle ilişkili öğrenme ve hafıza bozukluklarında terapötik potansiyelinin olabileceği vurgulanmıştır (Kuhad ve ark 2008a). Ayrıca diyabet tablosunda soğuk allodinisini ile sıcak hiperaljesini azalttığı, diyabetik nöropatinin tedavisinde yardımcı rolü olduğu (Kuhad ve Chopra 2008) ve diyabetik fare modelinde nöropatik ağrıyı azaltabileceği bildirilmiştir (Kuhad ve ark 2008b). Bunların yanında; ilerlemiş diyabetik retinopatili hastalarda önemli ölçüde daha düşük serum likopen düzeylerinin olduğu, diyabetik retinopatinin terapötik, şiddet ve tanısal açıdan değerlendirilmesinde likopenin yardımcı olabileceği ifade edilmiştir (Li ve ark 2010). Ayrıca tip 2 diyabetli post menopozal kadınlarda

ateroskleroz'un önlenmesi için ilave ilaç olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (Olfer'ev ve ark 2004).

1.5. Diyabette Oksidatif Değişiklikler

Diyabetin ve komplikasyonlarının patogeneğinde pek çok mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlar içinde en fazla kabul göreni ise artan serbest radikallerin komplikasyonlara neden olmasıdır (Memişoğulları 2005). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; tip II diyabet hastalarının oksidatif strese duyarlı oldukları, yüksek kan glukoze düzeyinin serbest radikallerin aracılık ettiğı lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğuna işaret edilmiştir (Likidilid ve ark 2010). Diyabetik nöropati komplikasyonu görülen diyabet hastalarında görülmeyenlere göre nitrik oksit serbest radikal düzeyinin daha yüksek, katalaz ve glutatyon antioksidan enzim aktivitelerinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır (Ozkul ve ark 2010). İnsüline bağımlı genç diyabet hastalarında ise antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz'ın plazma düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ayrıca lipid peroksidasyon belirteci olan MDA (malondialdehid)'nin plazma düzeyinin ise arttığı saptanmıştır (Indran ve ark 2004).

Çeşitli hayvan deneylerinde diyabetin kreatinin, kardiak enzim ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerini arttırdığı; hematolojik parametreleri, kardiak hipertrofi ve oksidatif stresi ise daha da kötüleştirdiğı ifade edilmiştir (Patel ve ark 2013). Bunların yanında; malondialdehid düzeyini önemli ölçüde arttırdığı (Morakinyo ve ark 2013), kan hücreleri ve böbrek dokusu metabolizmasında aerobik ATP sentezinin baskılanması, laktat birikimi ve laktik asidoz gelişimi gibi dramatik değişiklikleri oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan; diyabetin membran lipidlerinde tekrar yapılanmaya, mikrovizkositede değişikliklere yol açtığı, insülin reseptörlerini ve membrana bağılı Na (+), K (+)-ATPase ve Ca(2+)-ATPase'ı baskıladığı bildirilmiştir (Mikaelian ve ark 2013). Ayrıca protein karbonil (PCO) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin diyabetik ratların plazma ve karaciğer dokusunda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Korkmaz ve ark 2012). Bunların yanında diyabet tablosunda aminotransferaz, aspartat aminotransferaz ve alkalin fosfataz düzeylerinin arttığı, aksine hepatik glutatyon-S-transferaz, katalaz, plazma glutatyon, vitamin C ve total protein değerlerinin ise azaldığı belirtilmiştir (Ademiluyi ve Oboh 2012). Diğer taraftan diyabetin etkisiyle böbrekte TBARS (tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler) ve lipid hidroperoksit düzeylerinin arttığı saptanmıştır (Finamor ve ark

2012). Benzer olarak; beyin ve siyatik sinirde ise MDA, nitrik oksit (NO), total oksidan (TOS) ve oksidatif stres indeksinin önemli ölçüde arttığı, aksine total antioksidan (TAS)'ın ise azaldığı vurgulanmıştır (Acar ve 2012).

Diyabetin dişi genital sistem üzerine etkisi ile ilgili çalışmalarda ise; insüline bağımlı diyabetik prepubertal farelerin ovaryumlarda Cu/Zn SOD aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Powers ve ark 1996). Ayrıca diyabetik gebe ratların uteruslarında MDA düzeyinin arttığı, süperoksit dismutaz düzeyinin ise azaldığı bildirilmiş olup artmış oksidatif strese maruz kaldıkları ifade edilmiştir (Kinalski ve ark 2000). Ayrıca diyabetik rat vajinasında serbest oksijen türlerindeki artışın ve süperoksit dismutaz düzeyindeki azalmanın oksidatif stresi işaret ettiği ifade edilmiştir (Ferrini ve ark 2006).

1.6. Konneksinler

Gap junctionlar küçük moleküllerin hücreler arası geçişine olanak sağlayarak; gelişim, hücresel metabolizma ve hücresel büyümenin kontrolü gibi çeşitli biyolojik süreçlerin kontrolünde rol alırlar. Vertebralılarda, gap junctionlar konneksin gen ailesinden gelen proteinler tarafından şekillendirilir (Lampe ve Lau 2000). İnsanlarda 20, farelerde ise 21 üyeye sahiptirler (Meens ve ark 2013) ve tahmini molekül ağırlıklarına göre isimlendirilirler (Talbot ve Verrecchia 2012). Altı konneksin bir konnekson içine monte edilir (Meens ve ark 2013) ve iki konneksonun kenetlenmesi gap junction kanalları oluşur. Hücre-hücre apozisyonlarında bulunurlar. Çok sayıda hücre iki veya daha fazla konneksin eksprese eder (Sáez ve ark 2003). Hücre-hücre kanallarındaki konneksinlerin sayısı transkripsiyon ve translasyon ile regüle edilir ve bu süreçler sıkı kontrol altındadır (Nielsen ve ark 2012). Komşu hücreler gap junctionlarda mevcut olan hücreler arası kanallar arayıcılığıyla iyonları, ikincil mesajları ve küçük metabolitleri paylaşırlar (Bruzzone ve ark 1996). Gap junction kanalları; parakrin hücrelerarası sinyalizasyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda ve hücre ölümü indüksiyonu gibi patolojik durumlarda rol alırlar. Ayrıca hücrelerarası inositol trifosfat bağımlı kalsiyum dalgalarının yayılmasını kapsayan küçük moleküllerin transferinden sorumludurlar. Bunların yanında; heterojen hücrelerin metabolik ve elektriksel cevaplarının kordinasyonunda da rol alırlar (Sáez ve ark 2003). Konneksinler tarafından sağlanan hücre-hücre iletişimi hücre büyümesinin düzenlenmesi, farklılaşma ve gelişim gibi çeşitli hücresel fonksiyonlar için çok önemlidir (Wei ve ark 2004).

Konneksin-37 endotel hücrelerinde, monosit/makrofaj ve kan pulcuklarında bulunurken; konneksin-43 ağırlıklı olarak endoteliyal bir konneksindir ve düz kas hücreleri, yerleşik ve dolaşımdaki lökositler (nötrofil, dentritik hücreler, lenfositler, aktifleşmiş makrofajlar ve mast hücreleri) gibi çeşitli hücre tiplerinde bulunur (Pfenniger ve ark 2013). Ayrıca konneksin-43, gap junction alfa-1 proteini (GJA1) olarak bilinir ve testiküler gap junction proteini olarak da anılmaktadır. Seminiferus epitelinde gap junctionlar komşu sertoli hücreleri arasında ve sertoli ile cinsiyet hücreleri arasında yer alır. Bunların yanında; sertoli hücrelerinde proliferasyonun kesilmesi ve normal olgunlaşmada temel role sahiptirler (Sridharan ve ark 2007).

Konneksin-43 hücre-hücre iletişimde çeşitli rollere sahip olduğu gibi motilite ve göçün düzenlenmesinde de önemli rolleri vardır. Nöral hücrelerde konneksin-43 protein düzeylerinin azalması farelerde kortikal gelişim aşamasında nöronların göçünün düşmesi ile sonuçlanır. Diğer hücre tiplerinde de; konneksin-43 ekspresyonu ile hücre morfolojisi, adhezyon, motilite ve göç arasındaki paralellikler not edilmiştir (Matsuuchi ve Naus 2013). Ayrıca beyinde astroglialar, geniş miktarda konneksin eksprese ederler ve nöron ile oligodendrositlere kıyasla yüksek düzeyde gap junction iletişimi sergilerler (Theis ve Giaume 2012).

Konneksin genlerindeki mutasyonlar kardiovasküler anomaliler, periferik nöropati, sağırılık, deri hastalıkları ve katarakt gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (Wei ve ark 2004). Konneksin-26'daki resesif mutasyonlar orta-şiddetli sensorinöral işitme kaybına, dominant mutasyonlar ise duyma kaybı ve palmoplantar keratoderma gibi deri hastalıklarıyla sonuçlanır. Konneksin-43'teki dominant mutasyonlar ise; okulodentodigital displazi diye adlandırılan bir hastalık ile sonuçlanan gelişimsel bozukluklar sergiler (Laird 2008).

Konneksinler vasküler fizyolojide de önemlidir. Vasküler duvardaki radyal ve longitudinal hücre-hücre iletişimine destek olurlar (Morel ve Kwak 2013). Kalpte Cx40, Cx43, Cx45 eksprese olur. Normal elektriksel iletişim, kalp kasının koordineli senkronize kasılması ve kalbin normal embriyonik gelişimi için çok önemlidirler (Salameh ve ark 2013). Büyük arterlerde; endotel hücreleri konneksin 37, 43 ve 45 eksprese eder. Bundan başka; miyoendotel gap junctionlar vasküler tonun düzenlenmesinde görev alırlar (Haefliger ve ark 2004). Ayrıca gap junctionlar yoluyla oluşturulan hücre-hücre iletişimi

kültüre edilmiş neonatal rat ventriküler miyositlerin hayatta kalmasında önemli bir rol oynamaktadır (Yasui ve ark 2000).

Kalpde konneksin-43 kardiyak ventriküler gap junctionların majör proteinidir (Boengler ark 2009). Ayrıca konneksin-43 kardiomyosit mitokondrisinin iç membranında da lokalize olur (Schulz ve ark 2007). Konneksin-43 protein düzeyi; kalp yetmezliği ya da dilate kardiomyopati hastalarda ve aritmi ile ilişkili patofizyolojik durumlarda azalır (Boengler 2009).

Ovaryumda gap junctionlar esas olarak konneksin-43 ve 37'den oluşur. Folikülogenezis ve oogenesis'in düzenlenmesinde vazgeçilemez rolleri vardır. Ovarian konneksin-43 gonadotropinler tarafından regüle edilir. Normal ovaryum fonksiyonlarında özellikle konneksin-43 kanser baskılayıcı olarak görev yapar (Gershon ve ark 2008). Ovule olmamış oositlerde konneksin-43 miktarında yaşa bağlı artış gözlenir (Granot ve Dekel 1998). Ayrıca konneksin-43 düzeyi apoptotik indeks ile ilişkilidir ve konneksin-43 ekspresyonu granüloza hücre yaşamında önemli bir rol oynar (Krysko ve ark 2004). Konneksin-43 immunreaktivitesine doğumdan sonra folikülogenezis'in başında ulaşılır. Granüloza hücreleri arasındaki bağlantı özellikle konneksin-43 kanalları tarafından oluşturulur ve foliküler büyümenin devamlılığı için gereklidir. Konneksin-43 içeren gap junction kanalları foliküler gelişimin erken aşamalarında granüloza hücre popülasyonunun genişlemesi için gereklidir. Granüloza hücre katmanlarının düzenli gelişimindeki bir sorun oosit için şiddetli sonuçlar doğurabilir (Ackert ve ark 2001). Konneksin-43'ün yokluğunda erken preantral aşamada granüloza hücreleri büyümeyi durdurur (Gittens ve ark 2003). Konneksin-43 düzeyi su bufalolarının ovaryumunda atreziyle ilişkili olarak azalmaktadır. Gap junction iletişimdeki kayıp atrezi sürecinde koordineli bir rol oynamaktadır (Feranil ve ark 2005) ayrıca uygun folikül ve korpus luteum gelişimi için gereklidir (Durlej ve ark 2011). Bunların yanında; oksitosin konneksin-43 sentezini etkiler. Oksitosin östrodiol sentezini uyarır ve korpus luteumda küçük ve büyük hücreler arasında etkileşime olanak sağlayan konneksin-43'ün ekspresyonunu etkileyebilir (Khan-Dawood 1997). Konneksin-37 ise; oosit ile granüloza hücreleri arasındaki gap junctionlarda mevcuttur ve konneksin-37 eksik fareler olgun foliküllerden mahrum kalır. Ayrıca ovulasyonda sorunlar oluşur ve çok sayıda uygun olmayan korpus luteum gelişir. Buna ek olarak; mayotik yeterlilik elde edilmeden önce oosit gelişimi aksar. Çünkü hücreler arası kanallar vasıtasıyla olan hücre-

hücre sinyalizasyonu hücresel etkileşimin kordinasyonunu sağlar ve bu da başarılı oogenezis ve ovulasyon için gereklidir (Simon ve ark 1997).

Diyabetle ilgili çalışmalarda; yüksek glikozun kültür edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde protein kinaz C tarafından organize edilen konneksin-43'ün aşırı fosforilasyonunun gap junction hücreler arası iletişim aktivitesinin baskılanmasına yol açtığı bildirilmektedir. Bunun da diyabetle ilişkili makroangiopatinin gelişimine katkı sağlayabileceği vurgulanmıştır (Kuroki ve ark 1998). Ayrıca retinal perisitlerde yüksek glikozla sağlanan gap junction hücreler arası iletişiminin baskılanması ve konneksin-43'ün aşağı regülasyonunun (downregülasyon) diyabetik retinopatide vasküler hemostazisin bozulmasında rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Li ve ark 2003). Ovaryumda ise; diyabet tablosunda kumulusla çevrili oositlerde konneksin ekspresyonunun ve gap junction iletişiminin azaldığı, bu durumun bozulmuş oosit mayotik olgunlaşması ve zayıf gebelik sonucundan sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Ratchford ve ark 2008). Hem akut hemde kronik diyabet modellerinde daha küçük ve daha az gelişmiş foliküllerinin bulunduğu, kumulusla çevrili oositlerde konneksin-43 ekspresyonunun daha düşük olduğu, bu sebeple hiperglisemi ve hipoinsülineminin oosit olgunlaşması üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceği vurgulanmıştır (Chang ve ark 2005).

1.7. Apoptozis

Apoptozis organizmada görevini tamamlamış ya da hasara uğramış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümüdür (Turgut ve ark 2006). Hücre ölümü embriyogenezis, metamorfozis, endokrin bağımlı doku atrofisi ve normal doku döngüsü esnasında görülür (Erdoğan ve Uzaslan 2003). Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar. Bu sinyaller iki ana apoptotik yol olan hücre dışı/hücre ölüm reseptörü ve hücre içi/mitokondrial yolu harakete geçirir (Öztürk 2002). Apoptozis DNA parçalanması, plazma membranı kabarcıklanması, hücre hacminin küçülmesi (Kiess ve Gallaher 1998), fosfotidilserin molekülünün hücre membranının dış yüzeyine çıkması, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimciklerin oluşması gibi farklı biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Bu değişimleri saptamak için DNA fragmantasyonu (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL), agaroz jel elektroforezi ve Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) gibi

yöntemler kullanılabilir. Transmisyon elektron mikroskopisi apoptozun morfolojik olarak tanınması için iyi bir yöntemdir. Apoptozis ayrıca Kaspaz-3 ile immunohistokimyasal olarakta belirlenebilir (Güleş ve Eren 2008). Apoptotik hücreler apoptotik cisimlere ayrılarak fagositler ve çevre hücreler tarafından dokudan uzaklaştırılırlar (Öztürk 2002).

Çok sayıda hormon, sitokin ve büyüme faktörünün apoptozisin başlangıcını önleyerek genel ya da dokuya özel yaşamsal faktörler olarak görev yaptığı bilinmektedir. Buna ilave olarak; çok sayıda hormon ve büyüme faktörü fizyolojik ya da patolojik koşullar altında programlı hücre ölümünü kolaylaştırma ya da uyarma yeteneğindedir. Steroid hormonlar meme bezi, prostat, ovaryum ve testis gibi steroid bağımlı doku tiplerinde apoptozisin potansiyel düzenleyicileridir. Epidermal büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri yaşamsal faktörler olarak davranırlar. Hematopoetik hücreler, ovule olmamış foliküller, meme bezi, feokromasitoma hücreleri ve nöronlar gibi çok sayıda hücrede ise apoptozisi baskırlar (Kiess ve Gallaher 1998).

Programlanmış hücre ölümünü aktive eden fizyolojik mediatörler Fas ve Fas Liganttır (FasL). Hücre membran yüzeyindeki Fas-FasL etkileşimi, tümör hücrelerinin sitotoksik T lenfositler ve doğal katil/öldürücü (natural killer) (NK) hücreler tarafından öldürülmesinde çok önemli bir yere sahiptir. (Erdoğan ve Uzaslan 2003). Kaspazlar programlı hücre ölümünün çok önemli araçlarıdır. Bunların içinde; kaspaz-3 sıklıkla aktive edilen bir ölüm proteazıdır. Kaspaz-3 apoptotik kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, hücrenin parçalara ayrılması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi süreçlerle ilişkilidir (Porter ve Jänicke 1999). Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ailesi ise; hem apoptotik hem anti-apoptotik üyelere sahiptir. Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye göre proapoptotik veya anti-apoptotik sinyaller mitokondriyi etkilemektedir. Apoptotik sinyaller baskınsa sitokrom C apoptozom kompleksini oluşturmak için mitokondriden ayrılır. Tetiklenmiş olan apoptozis organ yetmezliğine neden olurken, apoptozun engellenmesi hiperplazi ve kansere neden olmaktadır (Yazıcı ve ark 2009).

Yapılan çeşitli çalışmalarda; diyabette retinal nöral hücre ölümünün erken oluştuğu ve retinada nöral hücre apoptozisindeki artış ile nörodejenerasyonun diyabetik retinopatinin önemli bir bileşeni olduğuna işaret edilmiştir (Barber ve ark 1998). Diyabetik hayvanların arka kök gangliyon nöronlarında ve schwan hücrelerinde mitokondrinin balon

gibi şişmesi ve mitokondrinin iç krsta tabakasının bozulması gibi apoptotik kaskadların bir parçasını oluşturan mitokondriyal değışiklikler rapor edilmiştir. Bu verilere dayanılarak; diyabetik hayvanlarda oksidatif stresin mitokondriyal değışiklikleri artırabildiğı ve bunun da programlı hücre ölümü kaspaz yolaklarının aktivasyonuna yol açabileceğı vurgulanmış olup, diyabetik duysal nöropati için yeni bir patojenik mekanizma ortaya konmuştur (Russell ve ark 1999).

Glikozla uyarılan serbest radikal artışının in vitro ve in vivo podosit apoptozisine yol açtığı bunun da tip 1 ve 2 diyabet modellerinde diyabetik nefropati oluşumuna yönelik yeni bir patomekanizma olabileceğı ifade edilmiştir (Susztak ve ark 2006). Ayrıca tübüler epitel hücrelerinin apoptozisi diyabetik böbrek hastalığının major özelliğidir ve hiperglisemi tübüler hücrelerde serbest radikal ile oksidatif stres üretimini tetikler (Habib 2013). Diyabetik böbrekte artmış oksidatif stresin ise apoptozisi indükleyebileceğı vurgulanmış olup diyabetik nefropatinin oluşumuna katı sunabileceğı bildirilmiştir (Zhang ve ark 1997).

Yüksek glikoz insan umbilikal ven endotel hücrelerinde apoptozisi yükseltebilir bu da diyabetik hastalarda hiperglisemi yoluyla potansiyel endotelial hasarı akla getirebilir (Baumgartner-Parzer ve ark 1995). Miyokard enfarktüsünden 12 hafta sonra diyabetik hayvanlarda apoptotik kardiyomiyosit sayısının daha yüksek olduğu saptanmıştır Ayrıca apoptotik kardiyomiyosit kaybının diyabet tablosunda miyokard enfarktüsünden sonra, progresif kalp dilatasyonu ve zayıf prognoza katkı sağlayan önemli bir mekanizma olabileceğı bildirilmiştir (Bäcklund ve ark 2004). Ayrıca kontrol edilemeyen diabetes mellitus'un miyokardial apoptoziste artış ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Feng ve ark 2013).

Diyabetik farelerin kumulus hücrelerinde parçalanmış mitokondri sıklığının arttığı, mitokondrinin transmembran potansiyelinin azaldığı ve mitokondri dağılımında bir kümelenmenin olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca maternal diyabetin etkisiyle mitokondrial bozulmaların sitokrom C serbest kalması yoluyla kumulus hücrelerinde apoptozise yol açıldığına yönelik deliller sunulmuştur. Bununla birlikte; diyabetin kumulus hücreleri üzerine zararlı etkileri ile oosit için gerekli olan sinyal ve beslenme etkileşiminin bozabileceğı ve bunun da diyabetik dişilerde oosit yetersizliği ile zayıf gebelik sonuçlarına yol açabileceğı belirtilmiştir (Wang ve ark 2010). Diğer taraftan histolojik değerlendirme

ve TUNEL boyama ile hem akut ve hemde kronik insülin bağımlı diyabet tiplerinde hayvanlarda çok sayıda apoptotik odak içeren, az gelişmiş ovaryum foliküllerin olduğu saptanmıştır. Ayrıca immunohistokimyasal olarak diyabetik hayvanların kumulus hücrelerinde tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) ve onun reseptörü olan KILLER ekspresyonlarında büyük ölçüde bir artışın sergilendiği görülmüştür (Chang ve ark 2005).

Yapılan literatür incelemelerinde diyabetin dişi genital sistem organlarının histolojisi üzerine etkisi konusunda sınırlı sayıda çalışmaya rastlanırken (Chang ve ark 2005, Ivanova ve ark 1977, Park ve ark 2001), likopenin diyabetik hayvanların dişi genital sistemine etkisi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan çalışmada, deneysel diyabet oluşturulan erişkin dişi ratların genital organlarında (ovaryum, uterus ve vajina) meydana gelen değişikliklerin histolojik, histokimyasal, histometrik, immunohistokimyasal, ELISA ve TUNEL yöntemleriyle incelenmesi ayrıca oral olarak verilen likopenin bu organlar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırmada Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 44 adet erişkin Wistar Albino ırkı (ortalama 160 g / 4 aylık) dişi rat kullanıldı. Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulunun izniyle (2011/042) gerçekleştirildi. Ratlar araştırma süresince 12 saat aydınlık/karanlık ortamda, $24\pm1^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığında, konvansiyonel koşullarda, *ad libitum* su ve yem ile beslendi.

Ratlara tek doz 50 mg/kg streptozotosin (STZ) (BioShop STR 201.1) 0,01 M sitrat tamponu pH: 4,5 içerisinde intraperitoneal (i.p.) yolla verilerek deneysel diyabet oluşturuldu (Malcangio ve Tomlinson 1998). Üç gün sonra ratların kuyruğundan alınan kan örneklerinde glikometre (Contour TS Bayer) ile açlık kan glikoz değerleri ölçüldü (Ali ve ark 2009). Açlık kan glikoz düzeyi 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar çalışmaya dahil edildi (Kuhad ve ark 2008a, Kuhad ve ark 2008b). Kontrol grubundaki hayvanlara ise eşit miktarda 0,01 M sitrat tamponu pH: 4,5 i.p. olarak uygulandı. Deney sürecinde 9 hayvan ölürken, 5 hayvanda deneysel diyabet oluşmadı. Bu sebeple çalışmada toplam 30 hayvan kullanıldı. Ayrıca çalışmada kullanılan likopen (%10 FS DSM, Redivivo TM, Code 7803) DSM Gıda Ürünleri Tic. Ltd. Şti. (İstanbul)'den temin edildi ve vücut ağırlığına göre günlük 4 ml/kg mısır yağında 4 mg/kg likopen olacak şekilde hayvanlara gavaj yoluyla verildi. Yalnızca mısır yağı verilen gruplara ise, vücut ağırlığına göre günlük 4 ml/kg mısır yağı aynı yolla verildi.

Streptozotosin ile diyabet oluşturulduktan 3 hafta sonra kontrol ve diyabetik ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

I. Grup (kontrol+mısır yağı, n=6): Gavaj yoluyla 4 hafta boyunca her gün 4 ml/kg mısır yağı verildi.

II. Grup (kontrol+likopen, n=6): Gavaj yoluyla 4 hafta boyunca her gün 4 ml/kg mısır yağında çözündürülerek 4 mg/kg likopen verildi.

III. Grup (diyabet+mısır yağı, n=8): Gavaj yoluyla 4 hafta boyunca her gün 4 ml/kg mısır yağı verildi.

IV. Grup (diyabet+likopen, n=10): Gavaj yoluyla 4 hafta boyunca her gün 4 ml/kg mısır yağında çözündürülerek 4 mg/kg likopen verildi.

Likopen uygulamasının son haftasında bütün gruplarda yer alan hayvanların düzenli östrus siklusu gösterip göstermedikleri vajinal smear yöntemi ile belirlendi (Marcondes ve ark 2002). Çalışmanın başlangıcında ve sonunda (8. hafta) tüm gruplardaki ratların vücut ağırlıkları; çalışmanın başlangıcında, likopen uygulamasının başında (4. hafta) ve çalışmanın sonunda (8. hafta) ise açlık kan glikoz değerleri ölçüldü. Deney sonunda östrus siklusunun diöstrus döneminde olan hayvanlar hafif eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile öldürüldü (Garris ve ark 1982). Öldürülen hayvanların sağ ovaryumu, uterusun sağ kornusu ve vajina örnekleri alındı. Doku örnekleri % 4 paraformaldehit (pH: 7,4) tespit solüsyonunda +4 °C’de 24 saat tespit edildi ve rutin histolojik takip serilerinden geçirilip paraplasta gömülerek bloklandı. Ayrıca sol ovaryum sıvı nitrojenle dondurulup -80 °C’de saklandı.

2.2. Yöntem

Çalışmada deney sonunda elde edilen örneklerle histolojik, histokimyasal, immunohistokimyasal yöntemler ile ELISA tekniği uygulandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.2.1. Histolojik Yöntem

Paraplasta gömülmüş olan ovaryum, uterus ve vajina bloklarından 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Her hayvandan elde edilen kesitlere genel histolojik görünümün incelenmesi ve histometrik değişimlerin belirlenmesi amacıyla Crossman’ın üçlü boyama metodu uygulandı (Crossmon 1937).

2.2.1.1. Üçlü boyama metodunun uygulanması

Bu yöntemde aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Paraplast kesitler iki defa 5 dk ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100 alkol-I’de 3 dk, %100 alkol-II’de 3 dk, %96’lık alkol’de 3 dk, %80’lik alkolde 3 dk, %70’lik alkolde 3 dk) bekletildi.
2. Distile suda iki kez çalkalandıktan sonra 5 dk akan çeşme suyunda yıkandı.

3. Kesitler çekirdek boyası için 8 dk Weigert's demir hemotoksilen solüsyonunda bekletildi. Daha sonra 5 dk süreyle akan çeşme suyunda yıkandı.
4. Metil karbonatta 2 dk çalkalandıktan sonra 5 dk akan çeşme suyunda, 3 dk da distile su içerisinde bekletildi.
5. Kesitler sitoplazma boyaması için asit fuksin boya solüsyonuna 4 kez batırılıp çıkarıldı. Daha sonra 4 kez distile suda çalkalandı.
6. Bağ doku beyazlaşınca kadar kesitler yaklaşık 15 dk fosfotungustik asitte bekletildi. Sonrasında 5 dk distile suda yıkandı.
7. Kesitler bağ doku boyaması için 1 dk anilin blue boya solüsyonunda bekletildi. Daha sonra 4 kez distile suda çalkalandı.
8. Kesitler %2'lik asetik asitte 3 dk bekletildikten sonra, sırasıyla hızlıca distile sudan ve %96 alkolden geçirildi.
9. Kesitler bu kez derecesi yükselen alkol serilerinden (%96'lık alkolde 3 dk, %100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk) geçirildi.
10. İki defa 5'er dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

2.2.1.2. Histolojik ve histometrik değişimlerin belirlenmesi

Dokularda normal histolojik görünümünden farklı olarak meydana gelen değişimler, sayısal değerler ve histometrik ölçümler Crossman's üçlü boyama yöntemi ile boyanan ve her hayvana ait iki kesitte incelenerek belirlendi. Çalışmada ovaryum foliküllerinin sınıflandırılması, klasik folikül sınıflandırılması göz önüne alınarak yapıldı (Pedersen ve Peters 1968, Zık ve ark 2010). Bu sınıflandırmada, granüloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Folikül sınıflandırması

Adlandırma	Tanım
Primordial folikül	Tek katlı yassı granüloza hücre (GH) katmanı
Primer folikül	Tek katlı kübik (GH) katmanı
Sekonder folikül	2-3 sıralı kübik (GH) katmanı
Küçük antral folikül	≤ 5 sıralı kübik (GH) ve küçük antral boşluklu
Büyük antral folikül	$5 \leq$ sıralı GH'li geniş antral boşluk, belirgin teka tabakalı

Gruplara göre folikül ve korpus luteum sayıları kesit bazında saptandı (Nilsson ve ark 2007). Ayrıca histopatolojik olarak; ovaryum kesitlerinde korpus luteumlar vakuolizasyon, intersitisyel alanlar ise hidropik dejenerasyon açısından incelendi. Belirlenen değişimler semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Bu amaçla subjektif puanlama (0: Negatif, 1: Zayıf, 2: Orta, 3: Şiddetli) yapıldı (Römer ve ark 2003). Ovaryumdaki folikül ve korpus luteum çapları ise; kesitlerde yer alan bütün folikül ve korpus luteumlar ölçülerek saptandı (Shima ve ark 2011).

Uterusta yüzey epiteli yüksekliği ile endometriyum kalınlığı beş farklı alandan yapılan ölçümlerle, bez epiteli yüksekliği ve bez alanı değerleri endometriyumda rastgele seçilen beş adet bezden elde edilen verilerle ve bez sayısı ise kesit bazında inceleme yapılarak saptandı (Alan ve Liman 2011, Yatkın 2005). Vajinada ise; lamina epiteliyalis yüksekliği ile tunika muskularis kalınlığı beş farklı alandan yapılan ölçümlerle tespit edildi (Alan ve Liman 2011). Ölçüm işlemleri görüntü analiz programı (Leica Q Win Standart) yardımıyla interaktif olarak gerçekleştirildi ve gerekli görülen yerlerden fotoğraflar çekildi.

2.2.2. Histokimyasal Yöntemler

Hayvanların ovaryum, uterus ve vajina bloklarından elde elen 5 µm kalınlığındaki kesitler organosilan (3-Aminopropyl-triethoxysilane, Sigma A3648) ile kaplanmış lamlara alındı. Periyodik Asit Schiff (PAS) yöntemi ovaryum, uterus ve vajina kesitlerine uygulandı (Culling 1985). Buna ek olarak; ovaryumda Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) (GenScript TUNEL Apoptosis Detection Kit Cat. No: L00297) tekniği uygulanarak apoptotik hücreler belirlendi (Zamani ve ark

2013). Uterusta ise, Alcian Blue (AB) pH: 2,5 (asidik mukosubstans) boyama metodu uygulanarak epitelial asidik mukosubstans histokimyasal olarak incelendi (Culling 1985).

2.2.2.1. Periyodik asit schiff boyama metodu

Bu yöntemde aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Paraplast kesitler iki defa 5 dk ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk, %96'lık alkol'de 3 dk, %80'lik alkolde 3 dk, %70'lik alkolde 3 dk) bekletildi.
2. Kesitler %1'lik periyodik asitte oda sıcaklığında 10 dk tutuldu ve ardından 10 dk akan çeşme suyunda yıkandı.
3. Daha sonra kesitler Schiff ayırıcında karanlık ortamda 15 dk bekletildi.
4. Kesitler potasyum metabisülfid I ve potasyum metabisülfid II solüsyonlarında 5'er dk tutuldu ve ardından 10 dk akan çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra distile suda çalkalandı.
5. Kesitler çekirdek boyası için 5 dk hemalaum solüsyonunda bekletildi ve ardından 15 dk süreyle akan çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra distile suda çalkalandı ve %96 alkolden hızlıca geçirildi.
6. Kesitler derecesi yükselen alkol serilerinden (%96'lık alkolde 3 dk, %100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk) geçirildi.
7. İki defa 5 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

2.2.2.2. Alcian blue pH: 2,5 boyama metodu

Bu yöntemde aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Paraplast kesitler iki defa 5 dk ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilende (%100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk, %96'lık alkolde 3 dk, %80'lik alkolde 3 dk, %70'lik alkolde 3 dk) bekletildi. Daha sonra distile suda iki kez çalkalandı.

2. Kesitler Alcian blue pH: 2,5 solüsyonunda 60 dk tutuldu. Ardından distile suda çalkalandı.
8. Kesitler çekirdek boyası için 5 dk kernechtrot solüsyonunda bekletildi. Daha sonra distile suda çalkalandı ve %96 alkolden hızlıca geçirildi.
3. Kesitler bu kez derecesi yükselen alkol serilerinden (%96'lık alkolde 3 dk, %100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk) geçirildi.
4. İki defa 5 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

2.2.2.3. TUNEL yöntemi

Bu yöntemde aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Paraplast kesitler iki defa 5 dk ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk, %96'lık alkol'de 3 dk, %80'lik alkolde 3 dk, %70'lik alkolde 3 dk) bekletildi. Daha sonra kesitler 2 defa 5 dk PBS (Tuzlu Fosfat Tamponu) pH: 7,4 içerisinde tutuldu.
2. Kesitler 37 °C'lik etüvde ve nemli ortamda proteinaz K (20 µl/ml) ile 15 dk inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığında PBS içerisinde 2 defa 5 dk bekletildi.
3. Kesitlere 25 °C'lik etüvde ve nemli ortamda, metanolde %3'lük H₂O₂ içeren bloking solüsyonu 10 dk uygulandı. Ardından kesitler oda sıcaklığında PBS içerisinde 2 defa 5 dk bekletildi.
4. Kesitlere etrafları kurutma kağıtı ile temizlendikten sonra 37 °C'lik etüvde, nemli ortamda ve ışıktan korunarak 60 dk taze hazırlanmış ve içerisinde denge (equilibration) tamponu, biotin-11-dUTP ve TdT bulunan TUNEL reaksiyon karışımı uygulandı. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında PBS içerisinde 3 defa 5 dk bekletildi.
5. Kesitler etrafları kurutma kağıtı ile tekrar temizlendikten sonra 37 °C'lik etüvde, nemli ortamda ve ışıktan korunarak 30 dk Streptavidin-HRP solüsyonunda inkübe edildi. Ardından kesitler oda sıcaklığında PBS içerisinde 3 defa 5 dk bekletildi.

6. Reaksiyonu ortaya çıkarmak için kesitlere 25 °C'lik etüvde, nemli ortamda ve ışıktan korunarak 2 dk 3,3'-diaminobenzidine (DAB) çalışma solüsyonu uygulandı. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında PBS içerisinde 3 defa 5 dk bekletildi.
9. Kesitler çekirdek boyası için 5 dk metil green solüsyonunda bekletildi. Daha sonra distile suda çalkalandı ve %96 alkolden hızlıca geçirildi.
7. Kesitler derecesi yükselen alkol serilerinden (%96'lık alkolde 3 dk, %100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3dk) geçirildi.
8. İki defa 5 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

2.2.2.4. Histokimyasal değişimlerin belirlenmesi

Dokularda her hayvana ait iki kesit değerlendirildi ve TUNEL için ovaryumda, PAS reaksiyonu için ovaryum, uterus ve vajinada, Alcian blue pH: 2,5 reaksiyonu için ise uterus kesitlerinde inceleme yapıldı. Ovaryumda gruplara göre apoptotik hücre sayıları büyük antral folikülerin granüloza katmanında ve korpus luteumlarda belirlendi. Kesitlerde yer alan bütün büyük antral foliküller ve korpus luteumlar değerlendirmeye alındı. Bu sebeple; büyük antral folikülerin granüloza katmanında 1764 μm^2 'lik birim alanda 5 farklı yerden sayım yapıldı (Eren ve ark 2008). Korpus luteumlarda ise, semi-kantitatif olarak subjektif puanlama yoluyla apoptotik hücre yoğunluk değerleri tespit edildi. Elde edilen veriler folikül ya da korpus luteum başına düşen değerler olarak saptandı (Durand ve ark 2004).

Uterusun yüzey ve bez epitel hücrelerindeki PAS ve AB pH: 2,5 pozitif reaksiyon yoğunlukları ile vajinanın lamina epiteliyalisindeki PAS pozitif reaksiyon yoğunluğu subjektif puanlama ile belirlendi (Witte ve 2012). Uterusta endometriyal bağ dokuda PAS pozitif hücre sayıları ise, 28224 μm^2 'lik birim alanda 5 farklı yerden sayılarak elde edildi (Eren ve ark 2008). Sayım ve puanlama işlemleri görüntü analiz programı (Leica Q Win Standart) yardımıyla interaktif olarak gerçekleştirildi ve gerekli görülen yerlerden fotoğraflar çekildi.

2.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem

Hayvanların ovaryum bloklarından elde elen 5 µm kalınlığındaki kesitler organosilan ile kaplanmış lamlara alındı. Konneksin-43 ekspresyonunun belirlenmesi için avidin biotin peroksidaz yöntemi uygulandı. Bu amaçla rabbit anti-connexin 43 poliklonal antikoru (Rabbit anti-connexin 43 polyclonal antibody, unconjugated, Bioss bs-0651P) kullanıldı.

Aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Paraplast kesitler iki defa 5 dk ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk, %96'lık alkol'de 3 dk, %80'lik alkolde 3 dk, %70'lik alkolde 3 dk) bekletildi. Daha sonra distile suda iki kez çalkalandı.
2. Antijen retrieval için kesitler 98 °C'de 0,01 M sodyum sitrat pH: 6 içinde mikrodalga fırında 3 defa 5 dk kaynatıldı. Ardından kesitler 20 dk oda sıcaklığında soğutuldu ve TBS (Tuzlu Tris Tamponu) pH: 7,4 ile 2 defa 5 dk yıkandı.
3. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler distile su ile hazırlanmış olan %3'lük H₂O₂'de 15 dk bekletildi.
4. Bloklama uygulaması için kesitler bloking solüsyonunda (Invitrogen Broad Spectrum Ref: 859043 Lot: 1018708A) 1 saat tutuldu.
5. Kesitler +4 °C'de 1 gece TBS ile 1/200 oranında dilüe edilmiş olan primer antikorda (rabbit anti-connexin 43 poliklonal antikor) bekletildi.
6. Ertesi gün kesitler önce TBS ile 2 defa 5 dk yıkandı. Ardından kesitler 1 saat oda ısısında biotinli ikincil antikorda (Invitrogen Broad Spectrum Ref: 859043 Lot: 1018708A) inkübe edildi.
7. Daha sonra kesitler TBS ile 2 defa 5 dk yıkandı ve ardından kesitler 1 saat oda ısısında streptavidin HRP (Invitrogen Broad Spectrum Ref: 859043 Lot: 1018708A)'de inkübe edildi.

8. Kesitler TBS ile 2 defa 5 dk yıkandı. Antikor bağlanma gösteren hücrelerin boyanması DAB kullanılarak (2 dk) gerçekleştirildi. Ardından kesitler distile su ile yıkandı.
9. Kesitler çekirdek boyası için Harris Hemotoksilen'de 10 saniye bekletildi. Daha sonra akarsuda çalkalandı, ardından distile suda 5 dk bekletildi ve %96 alkolden hızlıca geçirildi.
10. Kesitler derecesi yükselen alkol serilerinden (%96'lık alkolde 3 dk, %100 alkol-I'de 3 dk, %100 alkol-II'de 3 dk) geçirildi.
11. İki defa 5 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

Boyama yönteminde eş zamanlı olarak primer antikor ilave edilmeksizin aynı yöntem uygulanan doku kesitleri ise negatif kontrol olarak değerlendirildi.

2.2.3.1. Konneksin-43 yoğunluğunun değerlendirilmesi

Her hayvana ait iki ovaryum kesiti incelendi. Işık mikroskopunda (Leica DMLB) kahverengi reaksiyon pozitif olarak kabul edildi. Elde edilen kesitlerde değerlendirme; hedef dokunun boyanıp boyanmamasına, boyanmanın hedef dokudaki dağılımına ve boyamanın karakterine (nükleer ya da sitoplazmik) bakılarak yapıldı. Bu amaçla her ovaryum kesitindeki bütün primordial, primer, sekonder, küçük antral, büyük antral, atretik foliküller ile korpus luteumlar ve intersitisyel hücrelerin değerlendirilmesi subjektif puanlama ile yapıldı ayrıca gerekli görülen yerlerden fotoğraflar çekildi (Feranil ve ark 2005).

2.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü

Hayvanlardan elde edilen ovaryumlarda malondialdehid (MDA) düzeyi ELISA yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla öncelikle ovaryumlar homojenize edilerek homojenat hazırlandı. Daha sonra hazırlanan homojenatlardaki protein miktarı Lowry metodu ile tespit edildi. Ardından ELISA prosedürü uygulandı (Vinciguerra ve ark 2012).

2.2.4.1. Ovaryum dokularından homojenat hazırlanması

1. -80 °C’de muhafaza edilen ovaryumlar derin dondurucudan (Nuair Glacier) alınarak çözündürüldü ve çözöldükten sonra distile su ile yıkandı.
2. Dokular tartılarak her birinin ağırlıkları belirlendi ve ardından bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
3. Daha sonra parçalanan dokular tüplere alındı ve ağırlıklarının 10 katı miktarda soğuk fosfat tamponu (pH: 7,4, 150 mM) (1/10 w/v) ilave edildi.
4. Tüplerin içindeki dokular buz kabı içinde homojenizatör (IKA Overhead Stirrer; Germany) yardımıyla 2000 rpm’de 2 dk homojenize edildi.
5. Daha sonra elde edilen homojenizatlar 8000 g’de (11.300 devir/dk) +4 °C’de santrifüj (Nüve-Benc Top Centrifuge, NF 800 R, Turkey) edildi.
6. Elde edilen homojenatlar ependorf tüplere aktararak analiz aşamasına kadar -80 °C’deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.4.2. Ovaryum dokusunda Lowry metodu ile protein miktarı tayini

Yöntemin prensibi, alkali ortamda proteinlerin Cu^{+2} ile protein kompleksi oluşturması ve bu kompleksin fosfo molibdat-fosfo tungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu’s fenol reaktif) indükleyerek mavi-mor ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Yöntemin uygulanmasında aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. % 1’lik olarak hazırlanan sığır serum albümin (BSA) (Sigma A9418) (1 g BSA, 100 ml distile su, 1 g/dl) stok çözeltiden derişimi % 1, % 0,8, % 0,6, % 0,4, % 0,2, % 0,1, % 0,05 olan standart çözelti hazırlandı.
2. Lowry metodunda gerekli olan çözelti hazırlandı.

Çözelti A: % 1’lik bakır sülfat

Çözelti B: % 2’lik sodyum potasyum tartarat

Çözelti C: 0,2 M sodyum hidroksit

Çözelti D: % 4'lük sodyum karbonat

Çözeltiler hazırlandıktan sonra Lowry I ve Lowry II ayıraçları hazırlandı.

Lowry ayıraç I: 1 ml % 1'lik bakır sülfat, 1 ml % 2'lik sodyum potasyum tartarat, 49 ml 0,2 M sodyum hidroksit ve 49 ml % 4'lük sodyum karbonat karıştırılarak hazırlandı.

Lowry ayıraç II: Folin-Ciocalteu's ayıracı (Sigma F-9252) distile su ile eşit oranda sulandırılarak hazırlandı (v/v).

4. Deney tüplerine farklı oranlarda hazırlanmış olan BSA çözeltilerinden 250 µl alındı. Kör oluşturmak için iki tüpe aynı miktarda distile su konuldu. Daha sonra üzerlerine 1250 µl Lowry ayıraç I eklendi ve iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.

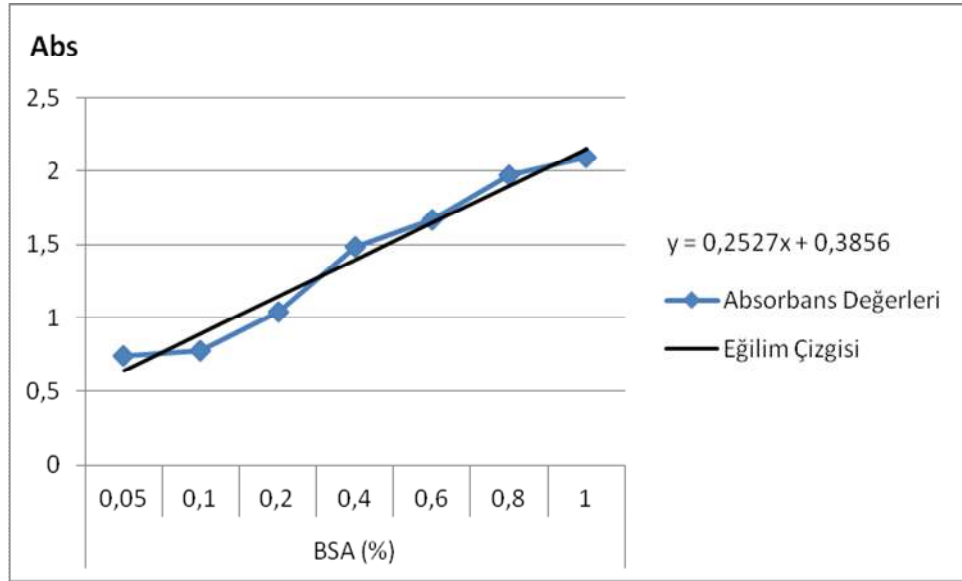
5. Bu sürenin sonunda 125 µl Lowry ayıraç II eklenip vortekslendi ve 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

6. Daha sonra UV spektrofotometrede çözeltilerin 750 nm'deki absorbans değerleri okunarak standart eğri oluşturuldu (Çizelge 2.2).

7. Aynı prosedür ovaryum dokularından hazırlanan homojenatlar için de uygulanarak absorbans değerleri belirlendi. Excel programında elde edilen standart eğriden yararlanılarak homojenatlardaki protein miktarları saptandı.

8. Daha sonra protein miktarlarının eşit olması için bütün numuneler PBS pH: 7,4 ile miktarları 10µg/ml olacak şekilde dilüe edildi ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Çizelge 2.2. BSA standart eğrisi



2.2.4.3. Ovaryum dokusunda malondialdehid düzeyinin belirlenmesi

Ovaryum MDA seviyesi hazır ticari kit (OxiSelect Adduct ELISA Kit STA-332) kullanılarak ELISA yöntemi ile belirlendi.

- Dilüe edilmiş doku örnekleri -80 °C'den çıkarıldı ve oda sıcaklığına gelmeleri beklendi.

Ayıracıların hazırlanması

- 1X Yıkama tamponu: 10X yıkama tamponu, deiyonize su ile 1X konsantrasyona dilüe edildi ve homojenize bir şekilde karıştırıldı (10 ml 10X yıkama tamponu ve 90 ml deiyonize su).
- Anti-MDA antikor ve sekonder antikor: Anti-MDA antikor ile sekonder antikor 1:1000 oranında assay dilüent ile dilüe edildi (1 µl anti-MDA antikor ve 999 µl assay dilüent, 1 µl sekonder antikor 999 µl assay dilüent).

Hangi kuyucuğa hangi maddenin konulduğunun bilinmesi için öncelikle haritalama işlemi yapıldı. Daha sonra aşağıda belirtildiği gibi plaka hazırlandı.

- 0.5 µg/mL MDA-BSA ve 10 µg/mL azaltılmış BSA'dan hazırlanan standartlar 1-8 arası kuyucuklara 100'er µl olarak konuldu.

- Blank (kör) olarak distile su kullanıldı ve 9. kuyucuğa 100 µl konuldu.
- Dilüe edilmiş doku örnekleri 10-26 arası kuyucuklara 100'er µl konuldu.

Plaka hazırlandıktan sonra analize şu şekilde devam edildi.

1. Plaka üzeri koruyucu filmle kapatıldıktan sonra karıştırıcı üzerinde, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.
2. Daha sonra her kuyucuk 250 µl 1X PBS ile 2 defa yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar boşaltıldı ve kuyucuklara hafifçe vuruldu. Ardından emici kağıt havlu ile fazla yıkama solüsyonu çıkarıldı.
3. Her kuyucuğa 200 µl assay dilüent konuldu ve 2 saat oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra her kuyucuk 3 defa 2. aşamadaki gibi yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 µl dilüe edilmiş anti-MDA antikoru konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra her kuyucuk 3 defa 2. aşamadaki gibi yıkandı.
5. Her kuyucuğa 100 µl dilüe edilmiş HRP ile konjuge sekonder antikor konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra her kuyucuk 5 defa 2. aşamadaki gibi yıkandı.
6. Substrat solüsyonu oda sıcaklığına gelene kadar ısıtıldı. Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 30 dk inkübe edildi.
7. Enzim reaksiyonu her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu konularak durduruldu ve sonuçlar spektrofotometrede 450 nm'de hemen okutuldu.

2.2.4.3.1. Malondialdehid düzeyinin değerlendirilmesi

Gruplardaki hayvanlara ait ovaryum dokularındaki MDA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan ELISA protokolü sonucunda bulunan absorbans değerleri, hazırlanan standart eğriden faydalanarak hesaplandı. Doku MDA değerleri protein değerlerine orantılanarak pmol/mg cinsinden verildi.

2.2.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS 17.00 paket programı kullanıldı. Vücut ağırlığı, açlık kan glikozu ve ovaryumda malondialdehid düzeyi açısından grup ortalamaları arasında farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analizi ile saptandı (Kanter ve ark 2012, Carroll ve ark 2002, Markey ve ark 2005). Ovaryumda; histopatolojik değişiklikler, folikül ve korpus luteum sayıları ile çapları, TUNEL pozitif hücre sayısı ve konneksin-43 boyanma yoğunluğu, uterus; yüzey ve bez epitel yükseklikleri, endometriyum kalınlığı, bez alanı, bez sayısı, yüzey ile bez epitelleri PAS ve AB pH:2,5 boyanma yoğunlukları ile endometriyal bağ dokudaki PAS pozitif hücre sayıları, vajinada ise; lamina epiteliyalis yüksekliği, tunika muskularis kalınlığı ve lamina epiteliyalis PAS pozitif boyanma yoğunluğu açısından grup ortalamaları arasında farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi (Ratchford ve ark 2008, Uchida ve ark 2002, Turhan ve ark 2008, Gray ve ark 2001, Shima ve ark 2011). Önemli fark bulunan gruplar için bu farkın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla da Duncan testi uygulandı. Aynı gruplara ait farklı zamanlarda elde edilen vücut ağırlığı değerlerinin analizi tekrarlayan ölçümler için Wilcoxon testi ile yapıldı (Ziegler ve ark 1989, Bingley ve ark 2003). Grup içi açlık kan glikozu değerlerinin analizi ise; tekrarlayan ölçümler için varyans analizi ile yapıldı ve Friedman testi uygulandı (Kempf ve ark 2010). Farkın önem kontrolleri ise Bonferonni düzeltmesi uygulanmış Wilcoxon testi ile yapıldı. İstatistiksel analizlerde elde edilen veriler ortalama±standart hata olarak ifade edildi ve farklılıkları $P<0,05$ (*), $P<0,01$ (**) ve $P<0,001$ (***) olan değerler önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Vücut Ağırlığı

Çalışmanın başlangıcında (0. hafta) ve sonunda (8. hafta) tüm gruptaki hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Kontrol ve diyabet gruplarına ait hayvanların vücut ağırlık değerleri Çizelge 3.1’de verildi. Çalışmanın sonundaki ağırlık değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Grupların çalışmanın başlangıcındaki ve sonundaki verileri kıyaslandığında ise; kontrol+mısır yağı ve kontrol+likopen gruplarında çalışmanın sonundaki ağırlık değerlerinin, çalışmanın başlangıcındaki ağırlık değerlerine göre anlamlı bir şekilde arttığı saptandı ($P<0,05$).

Çizelge 3.1. Kontrol ve diyabet gruplarında vücut ağırlığı değerleri (g) (Ort. $\pm$ S.H.)

Hafta	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
0	134,33 $\pm$ 4,50 ^B	153,00 $\pm$ 1,03 ^B	169,60 $\pm$ 1,99	184,50 $\pm$ 6,16	-
8	162,50 $\pm$ 6,94 ^A	184,50 $\pm$ 4,59 ^A	167,20 $\pm$ 3,91	174,40 $\pm$ 8,31	ÖD
P	*	*	ÖD	ÖD	

^{A,B}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan veriler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, *: $P<0,05$.

3.2. Açlık Kan Glikoz Düzeyi

Çalışmanın başlangıcında (0. hafta), likopen uygulamasının başında (4. hafta) ve çalışmanın sonunda (8. hafta) tüm gruptaki ratların açlık kan glikoz değerleri ölçüldü. Kontrol ve diyabet gruplarına ait hayvanların açlık kan glikoz değerleri Çizelge 3.2’de verildi. Veriler incelendiğinde; likopen uygulamasının başındaki ve çalışmanın sonundaki açlık kan glikoz değerlerinin kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($P<0,001$). Grup içi veriler kıyaslandığında ise; diyabet+mısır yağı ve diyabet+likopen gruplarında, likopen uygulamasının başındaki ve çalışmanın sonundaki açlık kan glikoz değerlerinin çalışmanın başlangıcındaki değerlere göre anlamlı şekilde arttığı görüldü (**: $P<0,01$).

Çizelge 3.2. Kontrol ve diyabet gruplarında açlık kan glikoz değerleri (mg/dl) (Ort.±S.H.)

Hafta	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
0	65,83±3,38	58,50±4,41	49,60±1,83 ^B	64,80±5,67 ^B	-
4	77,33±5,89 ^b	81,00±3,16 ^b	511,00±40,15 ^{A,a}	519,10±40,27 ^{A,a}	***
8	73,50±3,21 ^b	66,33±4,72 ^b	476,90±41,13 ^{A,a}	512,90±38,47 ^{A,a}	***
P	ÖD	ÖD	**	**	

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

^{A,B}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan veriler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, **: P<0,01, ***: P<0,001.

3.3. Östrus Siklusunun Takibi

Çalışmada likopen uygulamasının son haftasında bütün gruplarda yer alan hayvanların düzenli östrus siklusu gösterip göstermedikleri vajinal smear yöntemi ile belirlendi. Yapılan incelemede; kontrol gruplarına ait ratların östrus sikluslarının düzenli olduğu tespit edildi. Diyabet gruplarındaki ratlarda ise, siklusların düzensiz olduğu hatta birçok hayvanın diöstrus dönemine takılı kaldığı saptandı. Ayrıca likopen verilen diyabetli hayvanların östrus sikluslarının yine düzensiz olduğu görüldü.

3.4. Ovaryum

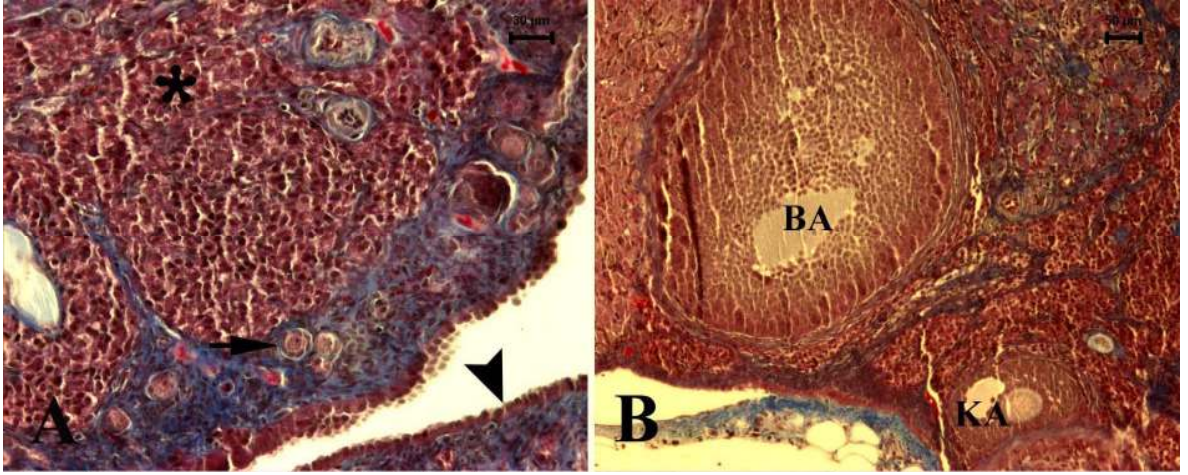
3.4.1. Histolojik Bulgular

Tüm gruplardaki hayvanların ovaryumlarından elde edilen kesitler Crossman'ın üçlü boyama yöntemi ile boyandı ve kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Ovaryumun genel histolojik yapısı incelendiğinde; kontrol gruplarında ovaryumun germinal epitel ile çevrili olduğu görüldü (Şekil 3.2.A). Yapısal olarak; ovaryumda korteks ve medulla katmanlarının varlığı izlendi (Şekil 3.1). Korteks katmanında çok sayıda gelişmekte olan foliküllerin bulunduğu saptandı. Primordial foliküller oositi çevreleyen tek katlı epitel hücrelerinden oluşmuştu (Şekil 3.2 A). Primer foliküllerin merkezde bir oosit ve onu saran tek katlı kübik epitel hücreleri ile çevrili olduğu görüldü. Sekonder foliküllerde birkaç katlı granuloza hücre katmanının bulunduğu ve zona pellusida ile teka internanın belirgin olduğu izlendi. Antral foliküllerin granuloza katmanı içinde folikülün büyüklüğüne göre farklı boyutlarda antrumu oluşturan boşluk ya da boşluklar şekillenmişti. Teka interna ve

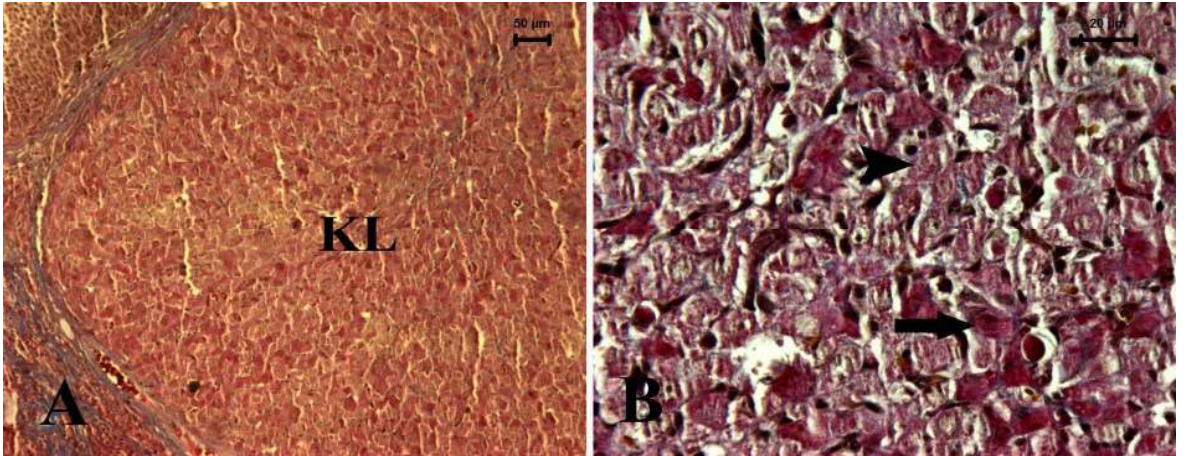
eksterna katmanları belirgindi (Şekil 3.2 B). Kesitlerde yer yer atretik foliküller gözlemlendi. Bunların yanında; organda korpus luteumlar bulunmaktaydı (Şekil 3.3). Korpus luteumlardaki koyu boyanan luteal hücrelerin teka luteal hücreler (TLH), daha açık boyananların ise ganüloza luteal hücreler (GLH) olduğu görüldü (Şekil 3.3 B). Foliküller arası bölgede intersitisyel hücreler gözlemlendi (Şekil 3.2 A). Medulla katmanının ise; dar bir alanda gevşek bağ doku yapısında olduğu ve kan damarlarının yoğun olarak yerleşim gösterdiği görüldü (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait ovaryumda dışta korteks (K), içte ise medulla (M) katmanı yer almaktadır. Üçlü boyama yöntemi. Bar: 100 µm.



Şekil 3.2. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait ovaryumun genel görünümü (A-B); germinatif epitel (okbaşı), primordial folikül (ok), intersitisyel hücreler (yıldız), küçük antral (KA) ve büyük antral foliküller (BA). Üçlü boyama yöntemi. Bar: 30 µm (A); 50 µm (B).



Şekil 3.3. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait ovaryum dokusundaki korpus luteum (A-B) görüntüsü (KL: Korpus luteum, Ok: Teka luteal hücre, Ok başı: Granüloza luteal hücre). Üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm (A); 20 µm (B).

Diyabet gruplarında; korpus luteumlarda vakuollerin, intersitisyel alanlarda ise; hidropik dejenerasyon alanlarının kontrollere göre arttığı gözlemlendi (Şekil 3.4 A-D). Çalışmada; ovaryumun histopatolojik açıdan yapılan incelemesinde elde edilen veriler Çizelge 3.3'te verildi. Korpus luteum vakuolizasyonunun kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı ve diyabet+likopen gruplarında anlamlı şekilde fazla olduğu saptandı ($P<0,01$). Benzer olarak; intersitisyel alanlarda hidropik dejenerasyonun kontrol+mısır

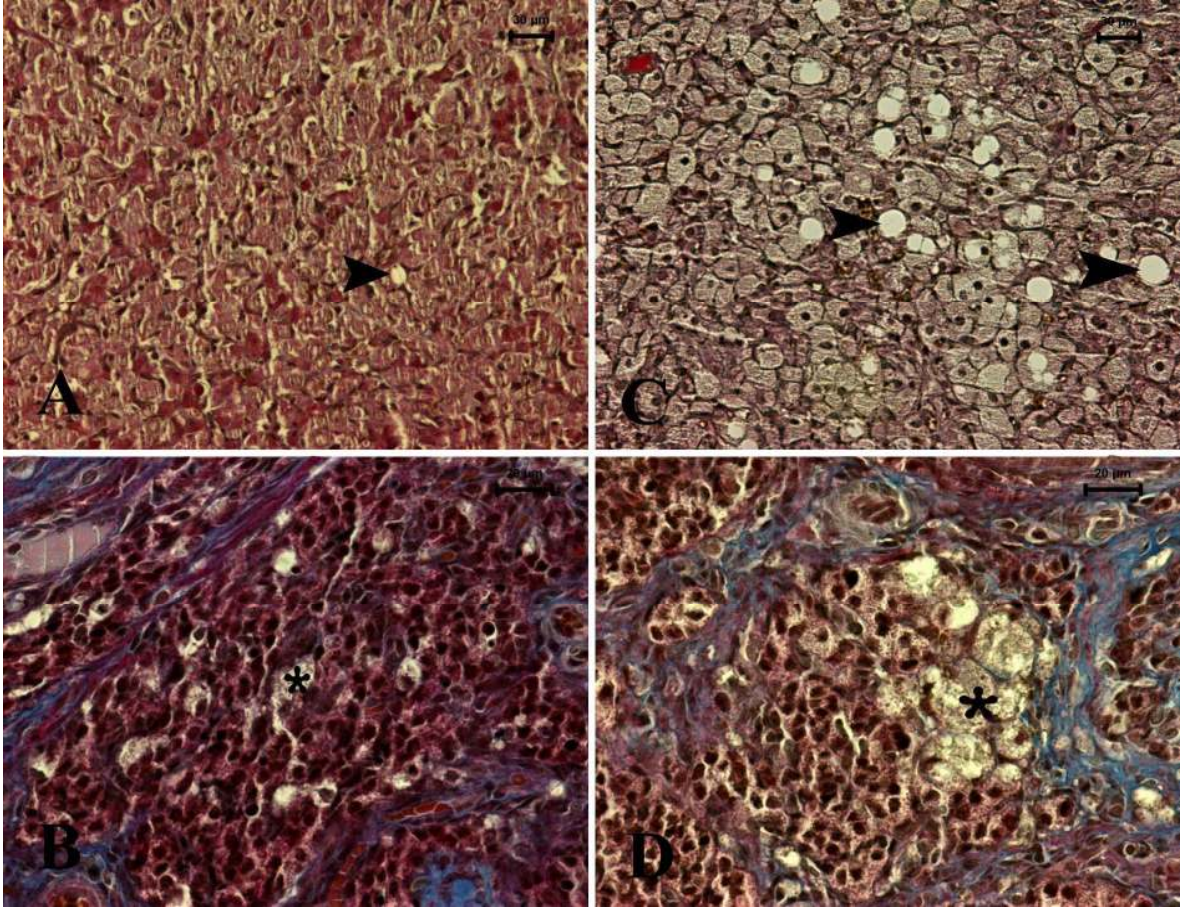
yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda önemli oranda arttığı tespit edildi ($P<0,05$).

Çizelge 3.3. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda histopatolojik yapıların yoğunluk değerleri (Ort. $\pm$ S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı n=6	Kontrol + Likopen n=6	Diyabet + Mısır Yağı n=8	Diyabet + Likopen n=10	P
Korpus Luteum Vakuolizasyon	0,20 $\pm$ 0,05 ^c	0,38 $\pm$ 0,08 ^{c,b}	0,46 $\pm$ 0,04 ^{b,a}	0,59 $\pm$ 0,06 ^a	**
İntersitisyel Alanlar Hidropik Dejenerasyon	0,50 $\pm$ 0,15 ^{c,b}	0,25 $\pm$ 0,13 ^c	1,06 $\pm$ 0,23 ^a	0,81 $\pm$ 0,16 ^{b,a}	*

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

*: $P<0,05$, **: $P<0,01$.



Şekil 3.4. Ovaryum dokusundaki histopatolojik değişimler. Kontrol+mısır yağı (A-B) ve diyabet+mısır yağı (C-D) gruplarına ait korpus luteumlar (A, C) ve intersitisyel alanlar (B, D). Kontrol+mısır yağı grubuna kıyasla, diyabet+mısır yağı grubunda korpus luteumlardaki vakuolizasyonda (C) (okbaşları) ve intersitisyel alanlardaki hidropik dejenerasyonda (D) (yıldız) artış dikkati çekmektedir. Üçlü boyama yöntemi. Bar: (A, C); 30 µm; 20 µm (B, D).

Folikül ve korpus luteum sayıları için yapılan değerlendirmede elde edilen veriler ise Çizelge 3.4'te verildi. Primordial, primer, sekonder, küçük antral, büyük antral ve atretik folikül sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmazken; kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda, kontrol+likopen grubuna göre ise diyabet+likopen grubunda korpus luteum sayılarının anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edildi ($P<0,01$).

Çizelge 3.4. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda folikül ve korpus luteum sayıları (Ort.±S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Primordial Folikül	8,36±1,65	7,33±1,47	7,33±1,22	6,47±0,87	ÖD
Primer Folikül	5,55±1,07	8,42±1,66	6,06±0,74	5,42±0,65	ÖD
Sekonder Folikül	1,36±0,41	2,00±0,53	2,06±0,37	1,21±0,16	ÖD
Küçük Antral Folikül	1,00±0,33	1,73±0,33	1,88±0,30	1,11±0,21	ÖD
Büyük Antral Folikül	3,36±0,75	3,75±0,67	2,72±0,39	2,68±0,31	ÖD
Atretik Folikül	6,00±0,85	6,75±1,06	8,44±1,41	6,68±1,10	ÖD
Korpus Luteum	4,55±0,54 ^{c,b}	2,50±0,35 ^c	7,53±0,62 ^a	5,26±1,12 ^{b,a}	**

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, **: P<0,01.

3.4.2. Histometrik Bulgular

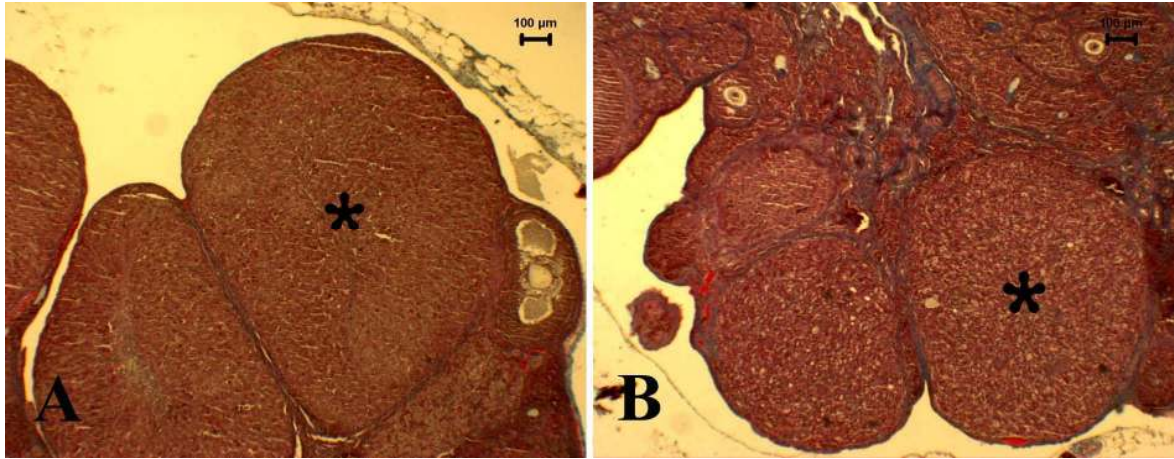
Çalışmada, ovaryumda folikül ve korpus luteum çapları incelendi ve yapılan ölçümlerde elde edilen veriler Çizelge 3.5’te verildi. Primordial, primer, sekonder, küçük antral ve büyük antral foliküllerin çaplarında gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmazken, korpus luteum çapının kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı ve diyabet+likopen gruplarında önemli düzeyde azaldığı saptandı (P<0,01) (Şekil 3.5).

Çizelge 3.5. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda folikül ve korpus luteum çapları (µm) (Ort.±S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Primordial Folikül	10,03±0,19	9,92±0,16	9,72±0,12	9,50±0,14	ÖD
Primer Folikül	20,14±0,77	18,40±0,51	19,48±0,42	19,29±0,73	ÖD
Sekonder Folikül	73,83±6,17	66,43±4,52	68,59±3,36	67,22±3,65	ÖD
Küçük Antral Folikül	159,99±10,67	180,97±11,29	181,82±9,50	166,81±8,27	ÖD
Büyük Antral Folikül	396,71±16,73	423,77±22,87	461,24±15,44	405,66±21,37	ÖD
Korpus Luteum	802,14±32,40 ^a	746,58±41,76 ^{a,b}	685,03±16,23 ^b	705,01±21,76 ^b	**

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, **: P<0,01.



Şekil 3.5. Kontrol+mısır yağı (A) ve diyabet+mısır yağı (B) gruplarında ovaryumda korpus luteum çapları. Korpus luteum çapının (yıldız işaretleri) kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda daha az olduğu görülmektedir. Üçlü boyama yöntemi. Bar: 100 µm.

3.4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

Çalışmada; tüm gruplardan elde edilen ovaryum kesitleri konneksin-43 antikoru ile immunohistokimyasal olarak boyandı. Ardından kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Ovaryumda konneksin-43 ekspresyonunun kontrol gruplarında germinatif epitelde, primordial ve primer foliküllerin folikül epitel hücrelerinin sitoplazmalarında olduğu belirlendi. Sekonder, küçük antral ve büyük antral foliküllerin granüloza hücre katmanında ve teka folikülünde ekspresyon saptandı. Bunların yanında; oositte konneksin-43 ekspresyonunun varlığı tespit edildi. Ayrıca atretik foliküllerde ve büyük antral foliküllerin korona radiata hücrelerinde konneksin-43 ekspresyonunun varlığı belirlendi. Korpus luteumlarda ise; luteal hücrelerde konneksin-43 ekspresyonunun bulunduğu gözlemlendi. İntersitisyel hücrelerde ve stromal alandaki bazı hücrelerde de ekspresyonun varlığı saptandı. Diyabet gruplarında ise; ovaryumdaki konneksin-43 ekspresyonunun kontrol gruplarına benzer olduğu tespit edildi (Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8).

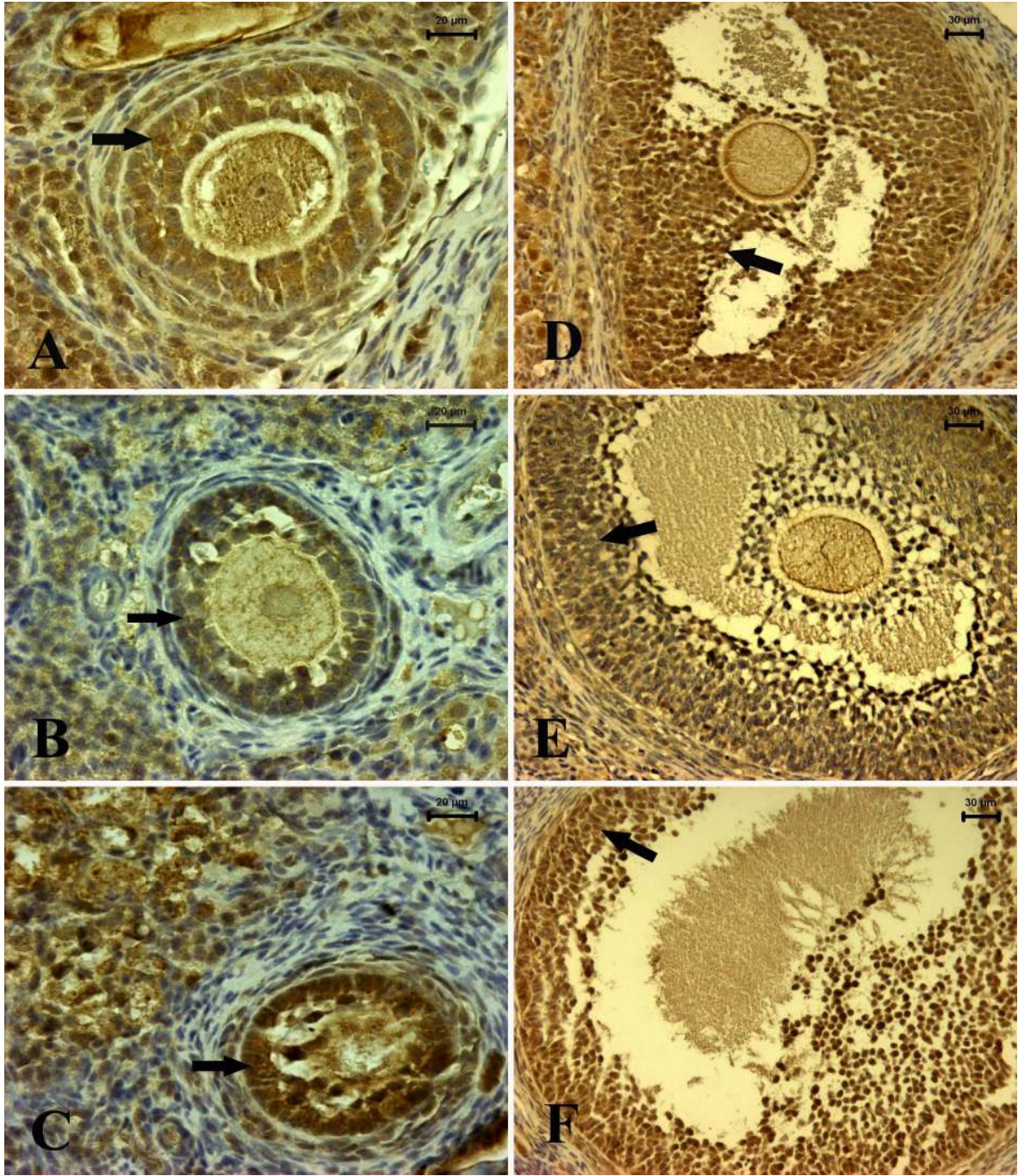
Gruplara göre ovaryumda subjektif olarak puanlanan konneksin-43 yoğunluğunu gösteren veriler Çizelge 3.6'da verildi. İncelenen bütün parametrelerde; kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda ovaryumdaki konneksin-43 ekspresyonunun azaldığı görüldü. Diyabet+mısır yağı ile diyabet+likopen grupları kıyaslandığında ise, atretik folikül dışında incelenen diğer bütün parametrelerde konneksin-43 ekspresyonunun diyabet+likopen grubunda arttığı tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler göz önüne alındığında; primordial ve atretik foliküller, intersitisyel hücreler ve korpus luteumlardaki luteal hücrelerde kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda konneksin-43 immunreaksiyonundaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,01$; $P<0,001$) (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Ayrıca primordial, sekonder ve büyük antral foliküllerde diyabet+mısır yağı grubuna göre diyabet+likopen grubunda konneksin-43 ekspresyonunun arttığı saptandı ($P<0,01$) (Şekil 3.6, Şekil 3.7).

Çizelge 3.6. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda konneksin-43 boyanma yoğunluğu değerleri (Ort.±S.H.)

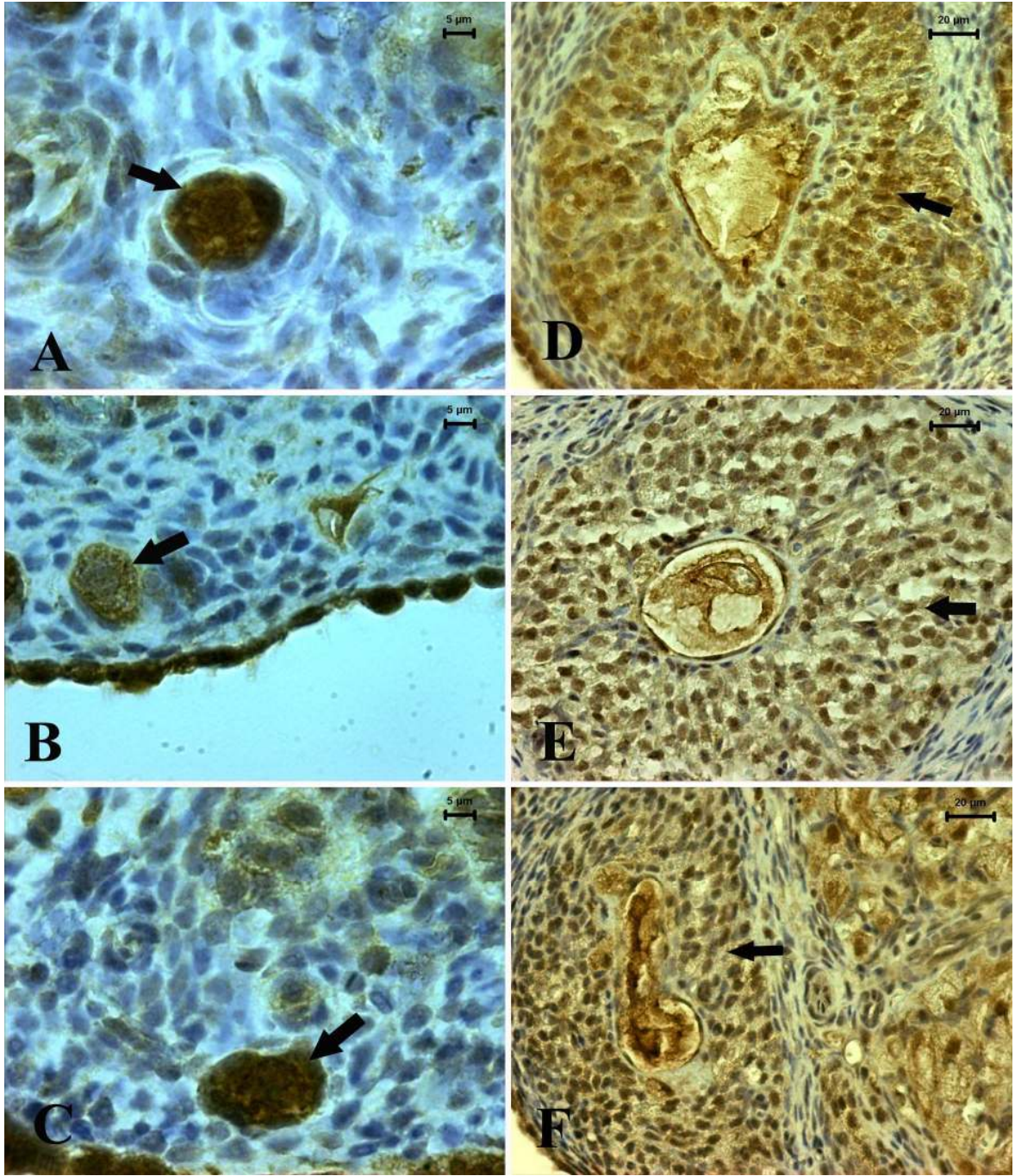
Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Primordial Folikül	2,57±0,50 ^a	2,44±0,06 ^a	2,27±0,60 ^b	2,50±0,05 ^a	**
Primer Folikül	2,55±0,06	2,45±0,06	2,40±0,06	2,60±0,05	ÖD
Sekonder Folikül	2,47±0,13 ^{c,b}	2,75±0,09 ^{b,a}	2,38±0,11 ^c	2,87±0,07 ^a	**
Küçük Antral Folikül	2,36±0,20	2,48±0,13	2,19±0,12	2,48±0,13	ÖD
Büyük Antral Folikül	2,16 ±0,12 ^b	2,46±0,08 ^a	2,08±0,10 ^b	2,45±0,08 ^a	**
Atretik Folikül	1,44±0,06 ^b	1,57±0,07 ^a	1,06±0,02 ^c	1,02±0,02 ^c	***
İntersitisyel Hücreler	1,36±0,15 ^{b,a}	1,46±0,14 ^a	1,00±0,00 ^c	1,16±0,08 ^{c,b}	**
Korpus Luteum	2,22±0,06 ^a	2,17±0,10 ^a	1,47±0,04 ^b	1,52±0,05 ^b	***

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

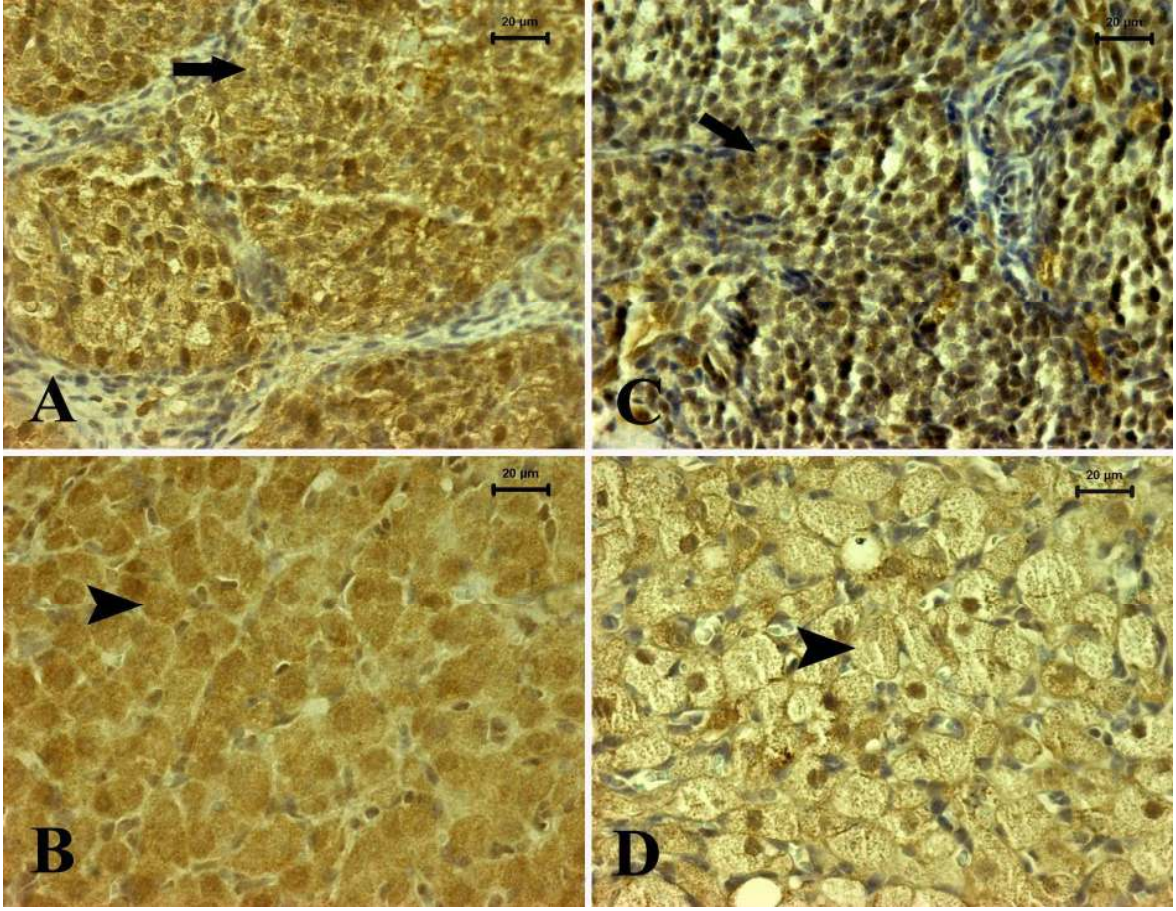
ÖD: Önemli değil, **: P<0,01, ***: P<0,001.



Şekil 3.6. Ovaryumda sekonder (A-C) ve büyük antral foliküllerde (D-F) konneksin-43 ekspresyonu. Diyabet+mısır yağı grubuyla kıyaslandığında (B, E); kontrol+likopen (A, D) ve diyabet+likopen (C, F) gruplarında sekonder ve büyük antral foliküllerde konneksin-43 ekspresyonun anlamlı bir şekilde fazla olduğu görülmektedir (oklar). Avidin biotin peroksidaz yöntemi. Bar: 20 μ m (A-C); 30 μ m (D-F).



Şekil 3.7. Ovaryumda primordial (A-C) ve atretik foliküllerde (D-F) konneksin-43 ekspresyonu. Primordial foliküllerde; diyabet+mısır yağı grubuyla (B) kıyaslandığında kontrol+mısır yağı (A) ve diyabet+likopen (C) gruplarında konneksin-43 ekspresyonun arttığı görülmektedir (oklar). Atretik foliküllerde ise; kontrol+likopen (D) grubuna göre diyabet+mısır yağı (E) ve diyabet+likopen (F) gruplarında konneksin-43 ekspresyonun azaldığı belirlendi (oklar). Avidin biotin peroksidaz yöntemi. Bar: 5 µm (A-C); 20 µm (D-F).



Şekil 3.8. Ovaryumda intersitisyel hücreler (A, C) (oklar) ve korpus luteumdaki luteal hücrelerde (okbaşları) (B, D) konneksin-43 ekspresyonu. Kontrol+mısır yağı grubuyla kıyaslandığında (A, B), diyabet+mısır yağı grubunda (C, D) intersitisyel hücreler ve korpus luteumdaki luteal hücrelerde konneksin-43 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Avidin biotin peroksidaz yöntemi. Bar: 20 µm.

3.4.4. Histokimyasal Bulgular

Çalışmada, tüm gruplarda Periyodik Asit Schiff reaksiyonu ile boyanan ovaryum kesitlerinde PAS pozitivite açısından gruplar arasında bir farklılığın olmadığı saptandı.

3.4.4.1. Apoptotik hücre yoğunluğu

TUNEL metodu ile yapılan incelemede apoptotik hücelere kontrol gruplarına ait ovaryumlarda; germinatif epitelde, primordial, primer ve sekonder foliküllerde rastlanmadı. Apoptotik hücreler büyük antral foliküllerin granüloza hücre katmanında, atretik foliküllerde ve korpus luteumlarda sıklıkla görüldü. Küçük antral foliküllerin

granüloza hücre katmanlarında, korpus albikanslarda, intersitisyel ve stromal alanlarda ise daha seyrek olarak bulundukları saptandı. Diyabet gruplarında ise bu yapılarda TUNEL pozitif apoptotik hücrelerin kontrollere göre artış gösterdiği dikkati çekti.

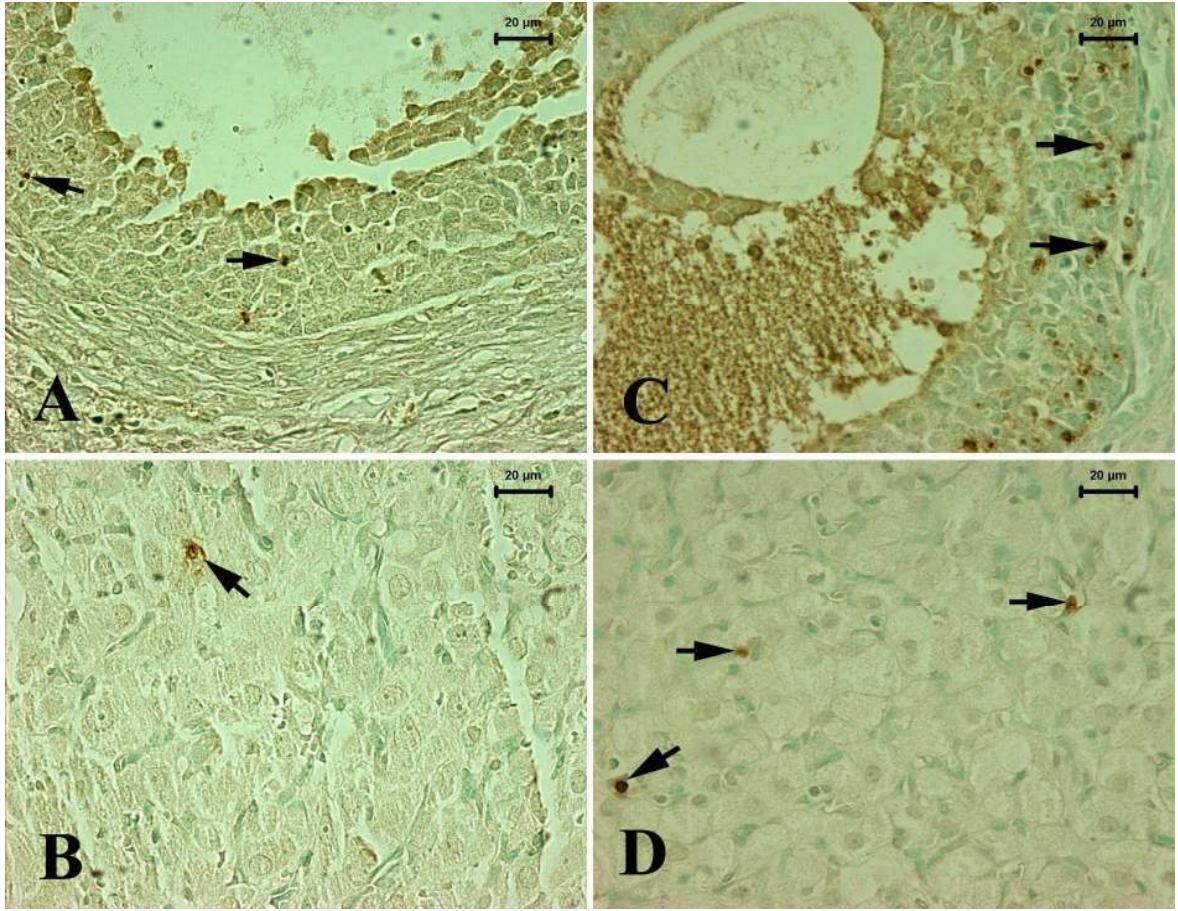
Gruplara göre ovaryumda apoptotik hücre yoğunluğunu gösteren veriler Çizelge 3.7’de verildi. Veriler incelendiğinde; büyük antral foliküllerin granüloza katmanlarındaki ve korpus luteumlardaki apoptotik hücre sayılarının kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda yüksek olduğu görüldü ($P<0,05$) fakat korpus luteumda apoptozisteki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Şekil 3.9). Ayrıca likopenin etkisiyle diyabetli hayvanların ovaryumunda apoptotik hücre sayısının azaldığı belirlenmekle birlikte; bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı da görülmüştür.

Çizelge 3.7. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda büyük antral foliküllerin granüloza katmanında birim alanda apoptotik hücre sayıları ve korpus luteumlarda apoptotik hücre yoğunluk değerleri (Ort. $\pm$ S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Büyük Antral Folikül	0,86 $\pm$ 0,18 ^b	1,14 $\pm$ 0,17 ^{a,b}	1,68 $\pm$ 0,21 ^a	1,44 $\pm$ 0,20 ^{a,b}	*
Korpus Luteum	0,58 $\pm$ 0,10	0,67 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,05	0,58 $\pm$ 0,06	ÖD

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, *: $P<0,05$.



Şekil 3.9. Ovaryumda büyük antral folikül (A, C) ve korpus luteumda (B, D) apoptotik hücreler. Kontrol+mısır yağı grubuyla kıyaslandığında (A, B); diyabet+mısır yağı grubunda (C, D) büyük antral foliküllerin granüloza katmanında ve korpus luteumda apoptotik hücre sayısının arttığı görülmektedir (oklar). TUNEL metodu. Bar: 20 µm.

3.4.5. Malondialdehid Düzeyi

Ovaryum dokularında yapılan MDA analizinde elde edilen veriler Çizelge 3.8'de verildi. Veriler incelendiğinde; kontrol+mısır yağı ve kontrol+likopen gruplarına göre diyabet+mısır yağı grubunda MDA değerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu görüldü ($P<0,01$). Ayrıca diyabet+mısır yağı grubuna göre diyabet+likopen grubunda MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük olduğu dikkati çekti.

Çizelge 3.8. Kontrol ve diyabet gruplarında ovaryumda malondialdehid değerleri (pmol/mg) (Ort.±S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Ovaryum	12,85±1,16 ^c	22,39±3,51 ^{c,b}	35,67±4,85 ^a	30,78±4,12 ^{b,a}	**

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

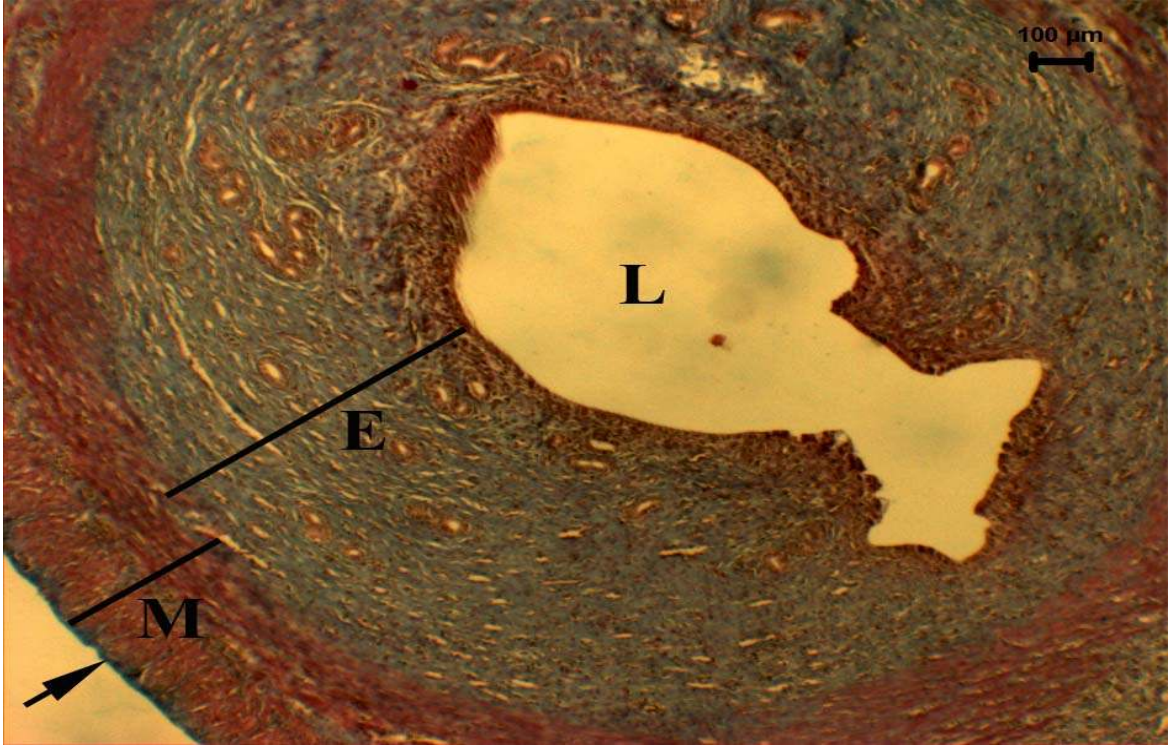
** : P<0,01.

3.5. Uterus

3.5.1. Histolojik Bulgular

Uterusun genel histolojik yapısı incelendiğinde; yapısal olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum katmanlarından oluştuğu görüldü (Şekil 3.10). Kontrol gruplarında uterus yüzey epitelinin tek katlı prizmatik yapıda olduğu belirlendi.

Endometriyumdaki bezlerin epitelinin prizmatik nitelikte olduğu görüldü. Endometriyum bağ dokusu içinde, çok sayıda bağ doku hücresine ve çeşitli büyüklüklerde kan damarlarına rastlandı. Miyometriyumda içte sirküler, dışta longitudinal olmak üzere iki düz kas katmanı mevcuttu. Dıştaki katmanda kas hücrelerinin bağ doku ile sarılı demetler halinde oldukları gözlemlendi. Kas katmanları arasında bol miktarda kan damarları ve bağ doku bulunmaktaydı. Organın en dışında bağ dokudan ince bir perimetriyum katmanı izlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Kontrol+mısır yağı grubundan bir hayvana ait uterusun genel görünümü. Lumen (L), endometriyum (E), miyometriyum (M), perimetrium (ok). Üçlü boyama yöntemi. Bar: 100 µm

Diyabet gruplarında uterusun genel yapısal özellikleri kontrol gruplarına benzer olmakla birlikte, uterusu bez sayıları açısından farklılıkların olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.9). Gruplara göre endometriyumdaki bez sayıları incelendiğinde; kontrol+mısır yağı grubuna göre, diyabet+mısır yağı grubunda bez sayılarının anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($P<0,01$) (Şekil 3.11).

3.5.2. Histometrik Bulgular

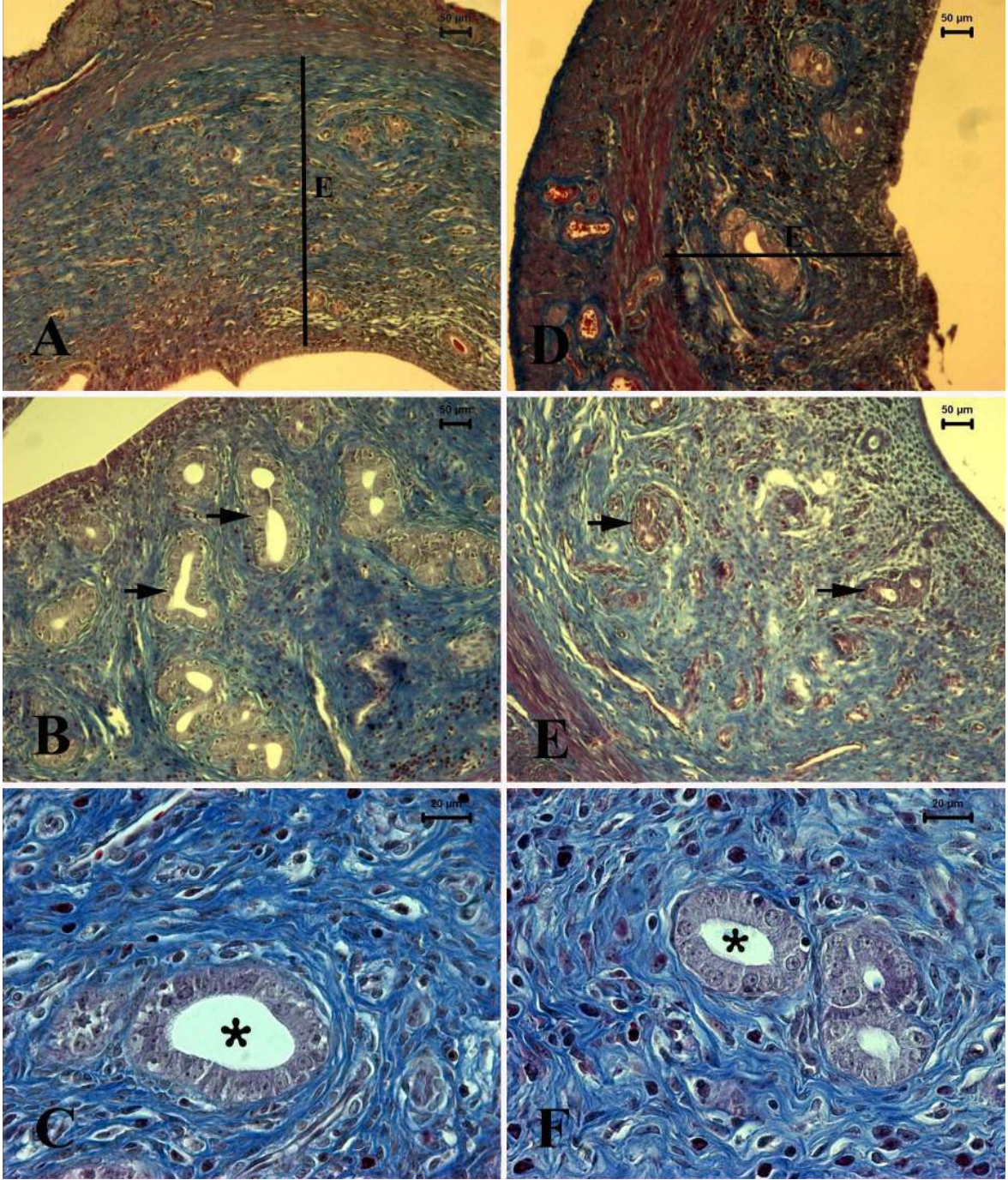
Uterusta yüzey ve bez epitel yükseklikleri, bez alanı ve endometriyum kalınlığı incelendi. Uterusa yönelik histometrik ölçümler ile ilgili veriler Çizelge 3.9'da verildi. Yapılan incelemede; bez alanının kontrol+likopen grubuna göre diyabet+likopen grubunda önemli ölçüde azaldığı tespit edildi ($P<0,001$). Endometriyum kalınlığında ise; kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında önemli bir azalmanın olduğu saptandı ($P<0,001$) (Şekil 3.11).

Çizelge 3.9. Kontrol ve diyabet gruplarında uterusu bez sayısı ve histometrik ölçüm değerleri (µm) (Ort.±S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Yüzey Epiteli Yüksekliği	16,58±0,66	16,53±0,32	16,65±0,59	15,06±0,35	ÖD
Bez Epiteli Yüksekliği	12,48±0,41	13,27±0,35	13,34±0,28	12,32±0,31	ÖD
Bez Alanı	2521,68±178,75 ^{b,a}	2817,76±77,98 ^a	2258,16±96,00 ^{c,b}	1944,40±87,46 ^c	***
Bez Sayısı	26,42±2,53 ^{b,a}	30,33±3,10 ^a	18,39±2,31 ^c	19,63±2,21 ^{c,b}	**
Endometriyum Kalınlığı	553,22±15,62 ^a	594,21±23,59 ^a	447,82±10,99 ^b	408,57±11,61 ^b	***

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, **: P<0,01, ***:P<0,001.



Şekil 3.11. Kontrol ve diyabet gruplarında endometriyum kesitleri. Kontrol+mısır yağı grubuna (A, B) göre diyabet+mısır yağı grubunda (D, E) endometriyum kalınlığının (A, D) (siyah çizgiler, E harfleri) ve bez sayısının (B, E) (oklar) azaldığı görülmektedir. Ayrıca kontrol+likopen grubuna (C) göre diyabet+likopen grubunda (F) bez alanının (yıldızlar) azaldığı saptandı. Üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm (A, B, D, E); 20 µm (C, F).

3.5.3. Histokimyasal Bulgular

Tüm gruplardaki hayvanların uteruslarından elde edilen kesitler, Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu ve Alcian Blue pH: 2,5 boyama yöntemleri ile boyandı ve kesitler ışık mikroskobunda incelendi.

3.5.3.1. PAS reaksiyonu

Uterusun PAS yöntemi ile boyanma özelliği incelendiğinde; kontrol gruplarında yüzey ve bez epitel hücrelerinin apikal bölümlerinde PAS pozitif granüllerin varlığı saptandı (Şekil 3.12.) Epitel hücrelerinin altındaki bazal membranın da PAS pozitif olarak boyandığı görüldü. Bunların yanında; endometriyum ile miyometriyumun kas katmanları arasındaki bağ dokuda PAS pozitif hücrelerin olduğu belirlendi. Diyabet gruplarında uterustaki PAS reaksiyonunun kontrol gruplarına benzer olduğu tespit edildi.

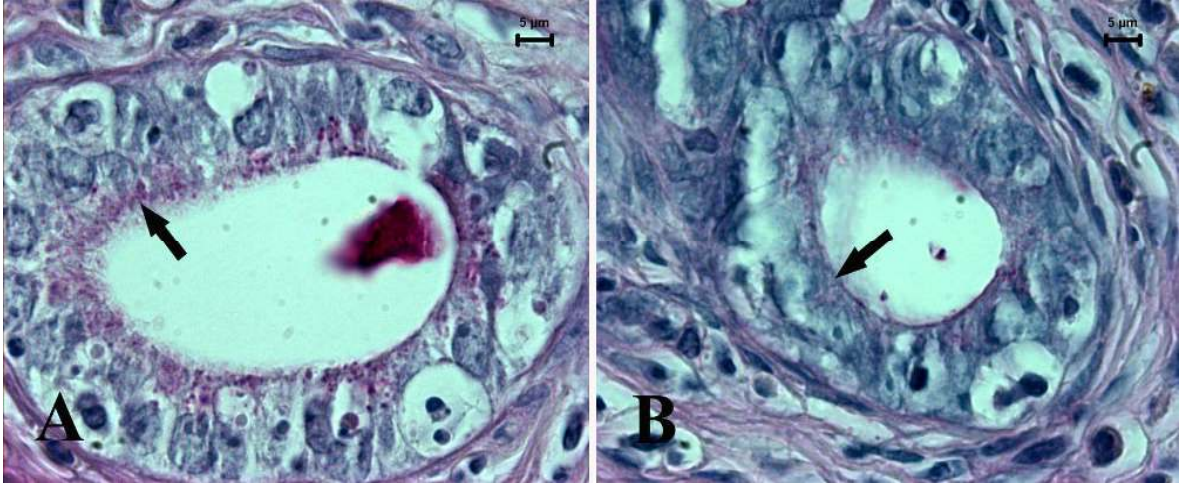
Gruplara göre yüzey ve bez epitellerindeki PAS pozitif aktivitesinin yoğunluğu ile endometriyal bağ dokudaki PAS pozitif hücre sayılarını gösteren veriler Çizelge 3.10'da verildi. Yüzey epitelindeki PAS pozitif aktivite ile endometriyal bağ dokudaki PAS pozitif hücre sayıları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü. Bez epitellerindeki PAS pozitif aktivitenin yoğunluğunun ise; kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($P<0,001$) (Şekil 3.12).

Çizelge 3.10. Kontrol ve diyabet gruplarında uterus yüzey ve bez epitellerinde PAS pozitif boyanma yoğunluğu değerleri ile endometriyal bağ dokuda birim alanda PAS pozitif hücre sayıları (Ort. $\pm$ S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Yüzey Epiteli	2,33 $\pm$ 0,14	2,17 $\pm$ 0,11	2,00 $\pm$ 0,12	1,90 $\pm$ 0,06	ÖD
Bez Epiteli	1,45 $\pm$ 0,08 ^a	1,55 $\pm$ 0,08 ^a	1,15 $\pm$ 0,04 ^b	1,26 $\pm$ 0,04 ^b	***
Endometriyal bağ doku	2,05 $\pm$ 0,26	2,20 $\pm$ 0,28	1,97 $\pm$ 0,22	1,85 $\pm$ 0,22	ÖD

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, ***: $P<0,001$.



Şekil 3.12. Kontrol+likopen (A) ve diyabet+likopen (B) gruplarına ait uterus bez epitellerinde PAS pozitif aktivite. Kontrol+likopen grubunda uterus bez epitelinde PAS pozitif reaksiyonun diyabet+likopen grubuna göre daha fazla olduğu görülmektedir (oklar). PAS reaksiyonu. Bar: 5 µm.

3.5.3.2. Alcian blue pH: 2,5 reaksiyonu

Uterusun Alcian Blue pH: 2,5 yöntemi ile boyanma özelliği incelendiğinde; kontrol gruplarına ait yüzey ve bez epitel hücrelerinin luminal sınırlarının AB pozitif olduğu görüldü (Şekil 3.13). Ayrıca; endometriyum stromasında, miyometriyumun sirküler ve longitudinal kas katmanları arasındaki bağ dokuda ve daha yaygın olarak perimetriyumda AB pozitif hücrelerin bulunduğu dikkati çekti. Diyabet gruplarında ise; uterustaki AB pozitif reaksiyonun lokalizasyonunun kontrol gruplarına benzer olduğu tespit edildi.

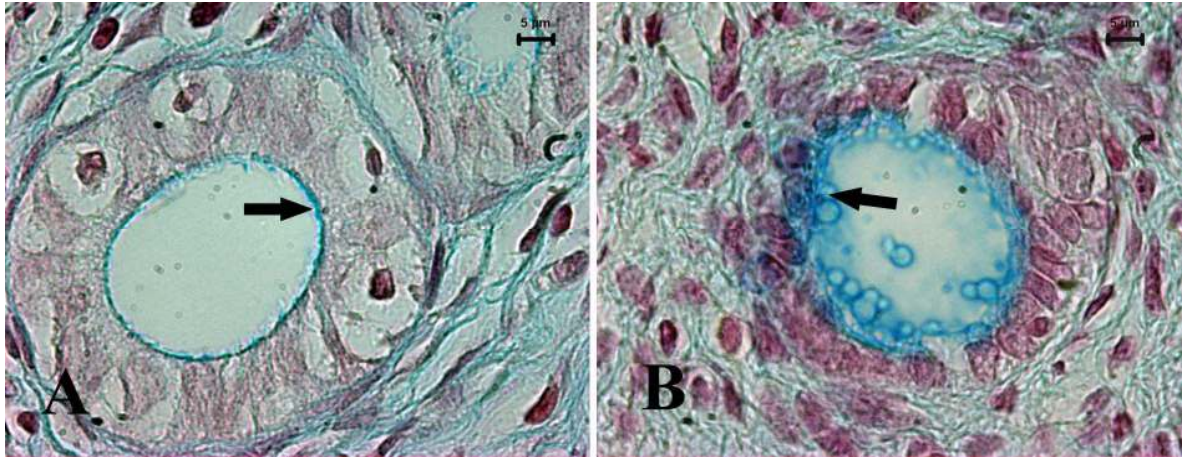
Gruplara göre yüzey ve bez epitellerindeki AB pH: 2,5 pozitif aktivite yoğunluğunu gösteren veriler Çizelge 3.11’de verildi. Gruplar arasında; bez epitellerindeki AB pozitif reaksiyonun kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı şekilde arttığı tespit edildi ($P<0,001$) (Şekil 3.13).

Çizelge 3.11. Kontrol ve diyabet gruplarında uterusu AB pH: 2,5 pozitif boyanma yoğunluğu değerleri (Ort.±S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Yüzey Epiteli	0,83±0,36	1,67±0,37	1,55±0,26	0,70±0,17	ÖD
Bez Epiteli	0,35±0,08 ^b	0,53±0,07 ^b	0,86±0,06 ^a	0,99±0,09 ^a	***

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, ***: P<0,001.



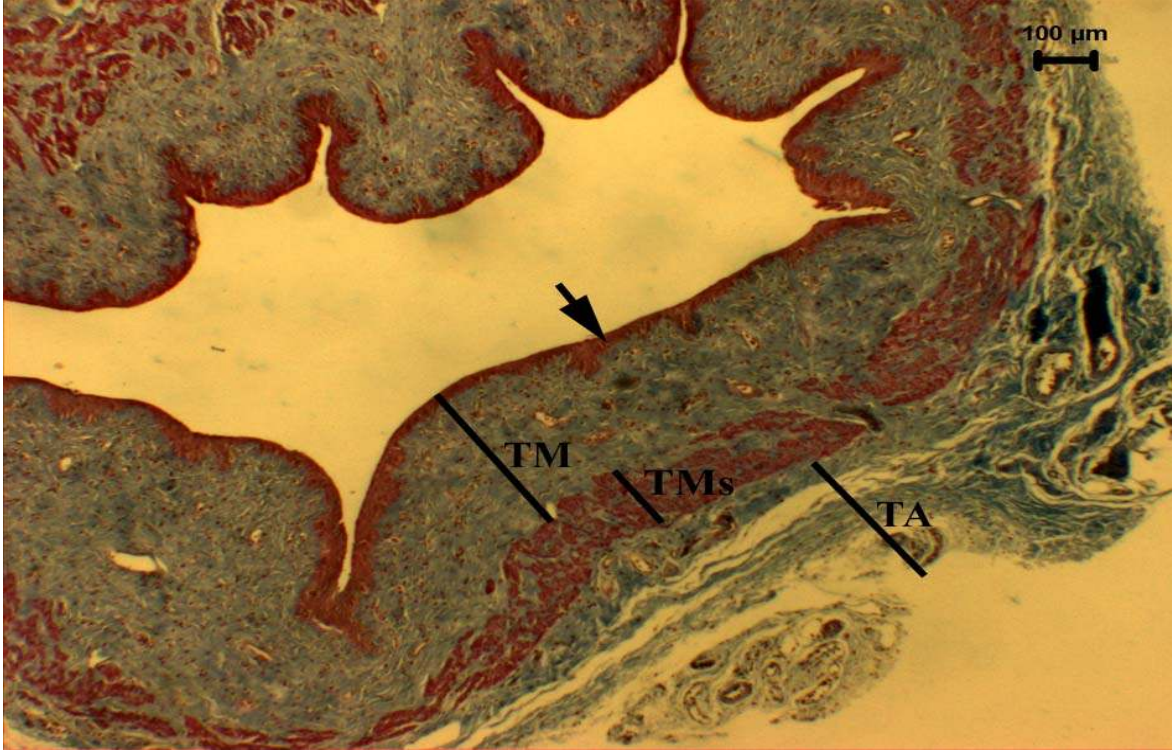
Şekil 3.13. Kontrol+likopen (A) ve diyabet+likopen (B) gruplarına ait uterus bez epitellerinde AB pH: 2,5 pozitif reaksiyon. Kontrol+likopen grubunda uterus bez epiteline AB pozitif reaksiyonun diyabet+likopen grubuna göre daha az olduğu görülmektedir (oklar). AB pH: 2,5 boyama yöntemi. Bar: 5 µm.

3.6. Vajina

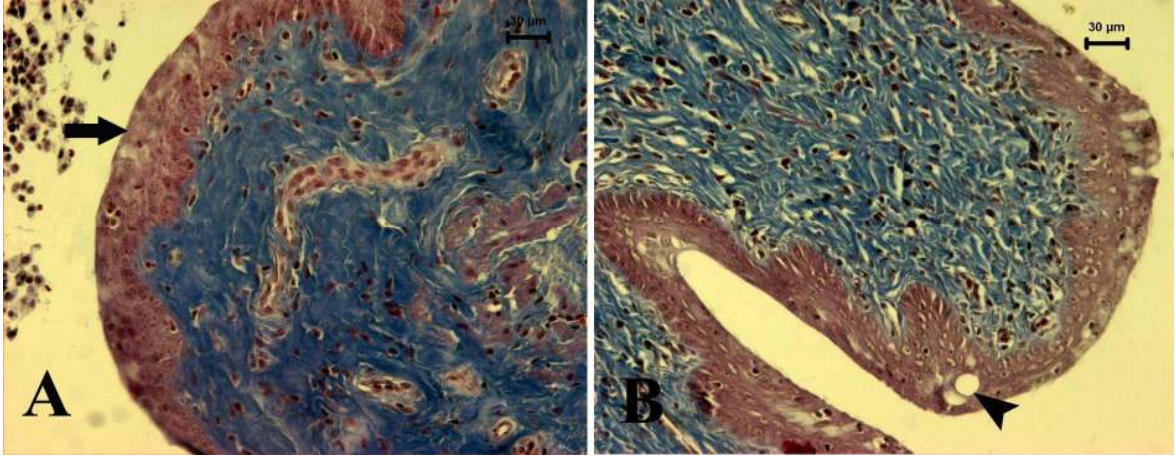
3.6.1. Histolojik Bulgular

Vajinanın genel histolojik yapısı incelendiğinde; yapısal olarak tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya katmanlarından oluştuğu görüldü (Şekil 3.14). Kontrol gruplarında lamina epiteliyalisin çok katlı yassı yapıda olduğu belirlendi. Tunika muskularisin içte sirküler dışta longitudinal düz kas katmanlarından oluştuğu gözlemlendi. Organın en dışında bağ dokudan bir tunika adventisya katmanı izlendi. (Şekil 3.14).

Diyabet gruplarında vajinanın genel yapısal özelliklerinin kontrol gruplarına benzer olduğu tespit edildi. Ancak kontrol gruplarından farklı olarak diyabet gruplarındaki bazı kesitlerde lamina epiteliyalis içinde çeşitli büyüklüklerde vakuollerin olduğu gözlemlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. Kontrol+mısır yağı grubuna ait bir hayvanda vajinanın genel görünümü; lamina epiteliyalis (ok), tunika mukoza (TM), tunika muskularis (TMs), tunika adventisya (TA). Üçlü boyama yöntemi. Bar: 100 µm.



Şekil 3.15. (A): Kontrol+mısır yağı grubuna ait bir hayvanın vajina lamina epiteliyalisi (ok). (B): Diyabet+mısır yağı grubuna ait bir hayvanda, vajina lamina epiteliyalisinde vakuol (okbaşı). Üçlü boyama yöntemi. Bar: 30 µm.

3.6.2. Histometrik Bulgular

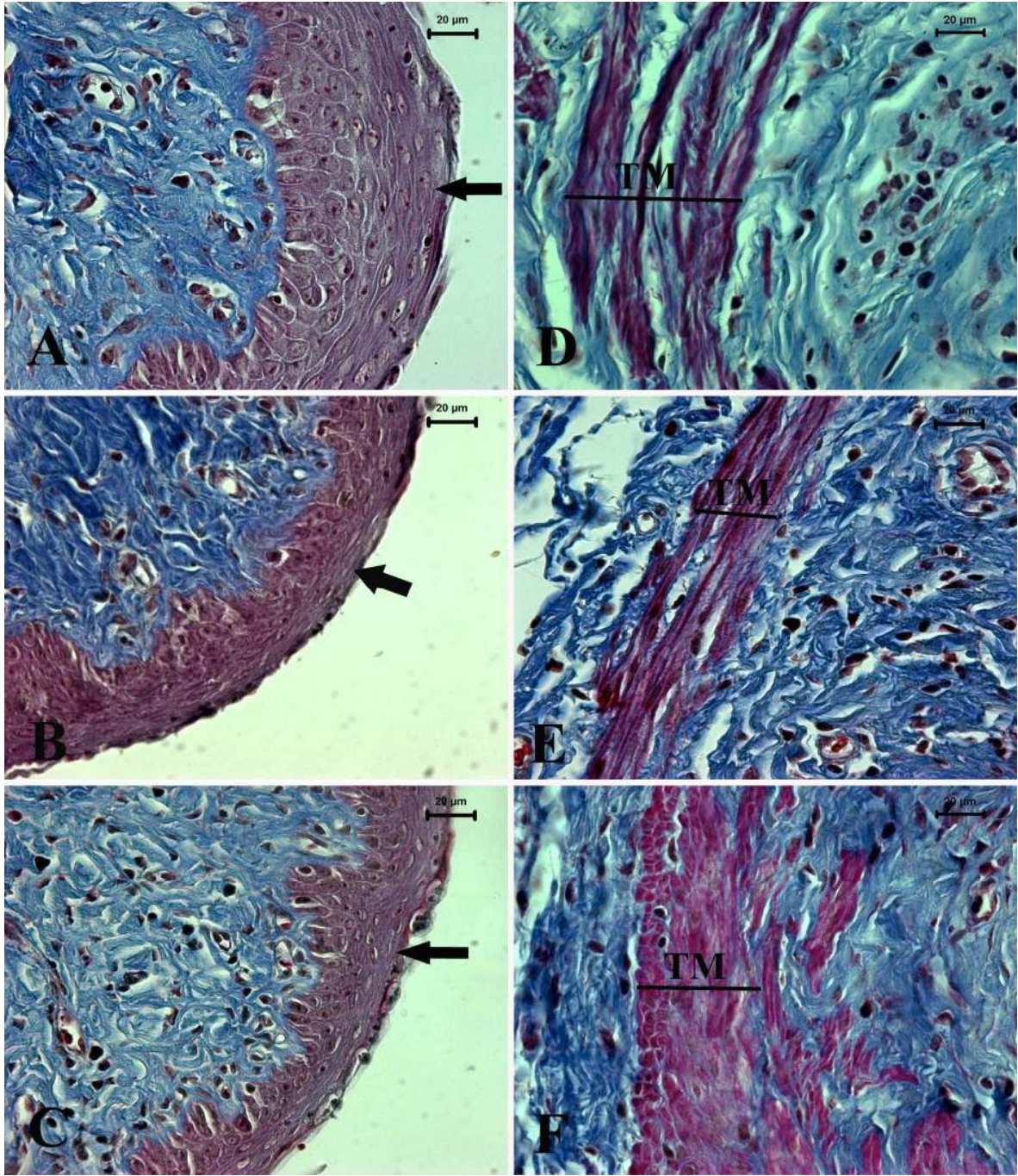
Vajinada lamina epiteliyalis yüksekliği ile tunika muskularis kalınlığı ölçüldü. Vajinaya ait histometrik ölçümler ile ilgili veriler Çizelge 3.12’de verildi. Lamina epiteliyalis yüksekliği incelendiğinde; kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü ($P<0,001$). Tunika muskularis kalınlığının ise; diğer gruplara göre diyabet+mısır yağı grubunda önemli ölçüde azaldığı; diyabet+mısır yağı grubuna göre diyabet+likopen grubunda ise arttığı saptandı ($P<0,001$) (Şekil 3.16).

Çizelge 3.12. Kontrol ve diyabet gruplarında vajinada histometrik ölçüm değerleri (µm) (Ort.±S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı n=6	Kontrol + Likopen n=6	Diyabet + Mısır Yağı n=8	Diyabet + Likopen n=10	P
Lamina Epiteliyalis Yüksekliği	52,56±2,44 ^b	61,14±2,70 ^a	44,88±1,36 ^c	41,63±1,08 ^c	***
Tunika Muskularis Kalınlığı	47,35±1,96 ^b	53,61±1,79 ^a	41,70±1,67 ^c	50,00±1,63 ^{b,a}	***

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

***: $P<0,001$.



Şekil 3.16. Kontrol ve diyabet gruplarında vajina kesitleri. Lamina epiteliyalis yüksekliğinin (A-C, oklar) kontrol+likopen grubuna (A) göre diyabet+mısır yağı (B) ve diyabet+likopen (C) gruplarında azaldığı görülmektedir. Tunika muskularis kalınlığının ise; (D-F) (siyah çizgiler, TM harfleri) ise, diyabet+mısır yağı grubuna (E, siyah çizgi, TM harfleri) göre kontrol+mısır yağı (D, siyah çizgi, TM harfleri) ve diyabet+likopen (F, siyah çizgi, TM harfleri) gruplarında daha fazla olduğu belirlendi. Üçlü boyama yöntemi. Bar: 20 µm.

3.6.3. Histokimyasal Bulgular

Tüm gruptaki hayvanların vajinalarından elde edilen kesitler Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu ile boyandı ve kesitler ışık mikroskopunda incelendi.

3.6.3.1. PAS reaksiyonu

Vajinanın PAS yöntemi ile boyanma özelliği incelendiğinde; kontrol gruplarında lamina epiteliyalisin yüzeye yakın katlarındaki hücrelerin PAS pozitif reaksiyon gösterdiği saptandı. Ayrıca lamina epiteliyalis altında yer alan bazal membranın da PAS pozitif olduğu görüldü (Şekil 3.17). Diyabet gruplarında ise; vajinadaki PAS pozitif reaksiyonun lokalizasyonunun kontrol gruplarına benzer olduğu tespit edildi.

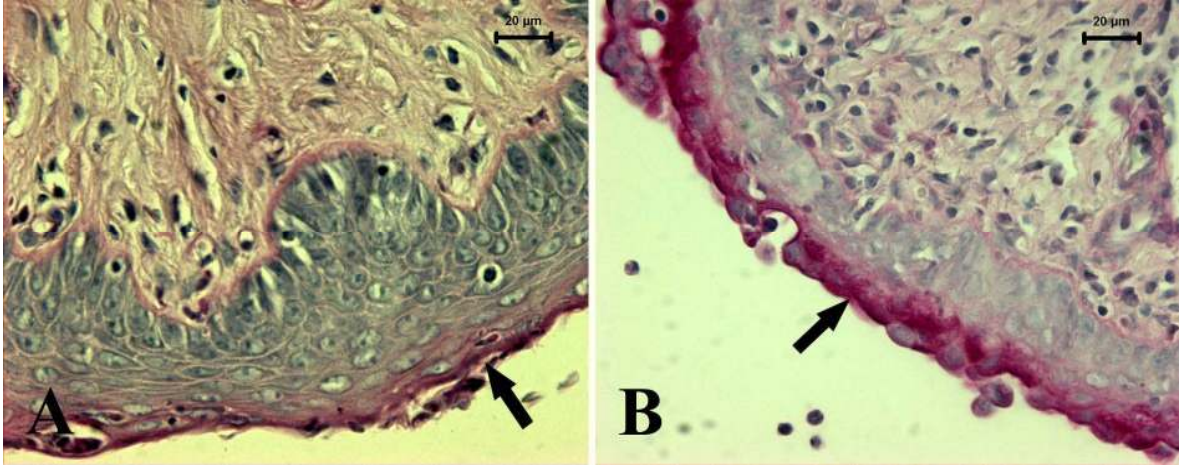
Gruplara göre lamina epiteliyalisteki PAS pozitivite yoğunluğunu gösteren veriler Çizelge 3.13'te verildi. Lamina epiteliyalisteki PAS pozitif aktivitenin kontrol+likopen grubuna göre, diyabet+mısır yağı ile diyabet+likopen gruplarında anlamlı şekilde arttığı tespit edildi ($P<0,05$) (Şekil 3.17).

Çizelge 3.13. Kontrol ve diyabet gruplarında vajina lamina epiteliyalisinde PAS pozitif boyanma yoğunluğu değerleri (Ort. $\pm$ S.H.)

Parametre	Kontrol + Mısır Yağı	Kontrol + Likopen	Diyabet + Mısır Yağı	Diyabet + Likopen	P
	n=6	n=6	n=8	n=10	
Lamina epiteliyalis PAS aktivitesi	1,58 $\pm$ 0,14 ^{a,b}	1,42 $\pm$ 0,22 ^b	2,11 $\pm$ 0,07 ^a	2,05 $\pm$ 0,21 ^a	*

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

*: $P<0,05$.



Şekil 3.17. Kontrol+likopen (A) ve diyabet+mısır yağı (B) gruplarına ait vajina kesitleri. Kontrol+likopen grubunda vajina lamina epiteliyalisinde PAS pozitif reaksiyonun diyabet+mısır yağı grubuna göre daha az olduğu görülmektedir (oklar). PAS reaksiyonu. Bar: 20 µm.

4. TARTIŞMA

4.1. Vücut Ağırlıkları

Diyabet ve likopenin vücut ağırlıkları üzerine etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir. Kuhad ve ark (2008b)'nın çalışmasında; tek doz 200 mg/kg streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturulmuş ve streptozotosin uygulamasından 4 hafta sonra 4. ve 8. haftalar arası diyabet+likopen gruplarındaki hayvanlara her gün tek sefer olacak şekilde 1, 2 ve 4 mg/kg dozlarında oral yolla likopen verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; diyabetik farelerin vücut ağırlıklarında kontrol farelere göre belirgin bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. Likopen uygulanan grupların tamamında ise; vücut ağırlığının diyabetik farelere kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Kuhad ve ark (2008a), 65 mg/kg STZ enjeksiyonu ile ratlarda deneysel diyabet oluşturmuşlar ve streptozotosin uygulamasının 3. gününden başlanarak 10. haftaya kadar diyabet+likopen gruplarındaki hayvanlara her gün tek sefer olacak şekilde 1, 2 ve 4 mg/kg dozlarında oral yolla likopen vermişlerdir.. Hayvanların vücut ağırlıkları incelendiğinde; kontrol ratlara kıyasla diyabetik ratların vücut ağırlığında kayda değer bir azalma olduğu, kronik likopen tedavisinin ise; diyabetik ratların vücut ağırlıklarını doza bağlı olarak önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Deney başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık değerleri incelendiğinde ise; diyabet grubunda vücut ağırlığının deney başlangıcına göre deney sonunda azaldığı, sırasıyla 1, 2 ve 4 mg/kg dozlarında likopen uygulanan diyabet+likopen gruplarında ise; deney başlangıcına göre deney sonunda vücut ağırlıklarının arttığı saptanmıştır.

Duzguner ve ark (2008), tek doz intraperitoneal 45 mg/kg STZ enjeksiyonu ile ratlarda deneysel diyabet oluşturmuşlar ve diyabet+likopen grubu hayvanlara streptozotosin uygulanan günden başlanarak 21 gün boyunca her gün tek sefer olacak şekilde 10 mg/kg dozunda oral yolla likopen vermişlerdir. Deney sürecinde hayvanların 0, 7, 14 ve 21. günlerde vücut ağırlıkları ölçülüp kaydedilmiştir. Veriler incelendiğinde; diyabet grubunda vücut ağırlığının 7, 14 ve 21. günlerdeki ölçüm değerlerinin önceki ölçüm değerlerine göre devamlı bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Diyabet+likopen grubunda ise; 14 ve 21. günlerdeki ölçüm değerlerinin daha önceki ölçüm değerlerine göre

artış gösterdiği saptanmış ve bununla birlikte; 14 ve 21. günlerdeki vücut ağırlıklarının diyabet grubuna kıyasla diyabet+likopen grubunda arttığı saptanmıştır.

Gao ve ark (2012), ratlarda tek doz intravenöz 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturmuşlar ve 8 hafta boyunca her gün 10, 30 ve 60 mg/kg dozlarında intragastrik entübasyonla likopen vermişlerdir. Sonuçlar incelendiğinde; kontrol grubu ratlara kıyasla diyabetik ratların vücut ağırlıklarında azalma tespit edilmiş, diyabet+likopen gruplarında ise diyabet gruplarına göre vücut ağırlıklarının arttığı saptanmıştır.

Aydın ve Çelik (2012), ratlara tek doz intraperitoneal 45 mg/kg STZ enjeksiyonu uygulayarak deneysel diyabet oluşturmuş ve hayvanlara 8 hafta boyunca her gün tek sefer olacak şekilde 4 mg/kg dozunda oral yolla likopen vermişlerdir. Hayvanların haftalık olarak vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Veriler incelendiğinde; beşinci haftadan başlayarak diyabet grubundaki hayvanların vücut ağırlıklarında önemli bir azalma gözlemlendiği, likopen tedavisinin ise; vücut ağırlık kaybını önlemede önemli bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Saad ve ark (2013), tek doz intravenöz 100 mg/kg STZ enjeksiyonu ile farelerde deneysel diyabet oluşturmuşlar ve hayvanlara 10 gün boyunca her gün tek sefer olacak şekilde 200 mg/kg dozunda oral yolla likopen vermişlerdir. Veriler incelendiğinde; likopenin etkisiyle diyabetik farelerin vücut ağırlıklarında önemli bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır.

Sunulan araştırmada; çalışmanın sonunda (8. hafta) elde edilen veriler incelendiğinde gruplar arasında vücut ağırlıkları açısından bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç, Kuhad ve ark (2008a), Kuhad ve ark (2008b), Duzguner ve ark (2008) ve Gao ve ark (2012)'nin bulgularıyla farklılık göstermektedir. Ayrıca çalışmada, likopen uygulamasının diyabetik hayvanların vücut ağırlıklarını diyabet+mısır yağı grubuna göre istatistiksel olarak önemli olmasada bir miktar arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuç ise; Kuhad ve ark (2008a), Kuhad ve ark (2008b), Duzguner ve ark (2008) ve Gao ve ark (2012) tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Grupların çalışmanın başlangıcındaki ve sonundaki verileri kıyaslandığında ise; kontrol gruplarında çalışmanın başlangıcına göre çalışmanın sonunda vücut ağırlıklarının anlamlı bir şekilde arttığı, diyabet gruplarında ise; istatistiksel açıdan önemli olmasada azaldığı

belirlenmiştir. Bu sonuçlar ise; Aydın ve Çelik (2012) ve Duzguner ve ark (2008)'nin çalışmalarıyla uyumludur. Çalışmanın sonunda kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında, ayrıca diyabet gruplarında çalışmanın başlangıcına göre çalışmanın sonunda vücut ağırlıkları açısından bir fark olmamasının nedeni diyabet gruplarına mısır yağı verilmesi olabilir. Diyabet tablosunda oluşacak olan ağırlık kaybı mısır yağı verilerek önlenmiş olabilir. Bununla birlikte; çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların uygulanan likopen dozu ve deney süresi gibi parametrelere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

4.2. Açlık Kan Glikoz Düzeyi

Likopenin açlık kan glikoz düzeyi üzerine etkileri ile ilgili çeşitli bulgulara ulaşılmıştır. Ali ve Agha (2009)'nın çalışmasında; hiperglisemik ratlara kademeli likopen dozlarının uygulanmasıyla kan glikoz seviyesinde doza bağlı bir azalma, insülin konsantrasyonunda ise bir artış belirlenmiştir. Ayrıca 90 mg/kg likopen dozunun en çok etkili olduğu vurgulanmıştır.

Zhu ve ark (2011) ile Gao ve ark (2012), diyabetik ratlara 10, 30 ve 60 mg/kg dozlarında likopen uygulamışlar ve diyabetik ratlarda likopen uygulanmasının glikoz seviyesinde doza bağlı bir azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir.

Ozmutlu ve ark (2012) 28 gün, Duzguner ve ark (2008) ise 21 gün boyunca diyabetik ratlara 10 mg/kg likopen vermişler ve diyabet+likopen grubunda plazma glikoz seviyelerinde bir düşüş belirlemişlerdir.

Kuhad ve ark (2008b) 4 hafta ile Kuhad ve ark (2008a) yaklaşık 10 hafta boyunca diyabetik ratlara 1, 2 ve 4 mg/kg dozlarında likopen vermişlerdir. Aydın ve Çelik (2012) ise; 8 hafta boyunca diyabetik ratlara 4 mg/kg dozunda likopen uygulamıştır. Sonuç olarak; kronik likopen tedavisinin diyabetik ratların kan glikoz düzeyini doza bağlı olarak önemli ölçüde iyileştirdiğini tespit etmişlerdir. Benzer olarak; Saad ve ark (2013), diyabetik hayvanlara 10 gün boyunca 200 mg/kg dozunda likopen uygulamışlar ve serum glikoz seviyesinin azaldığını belirlemişlerdir.

Sunulan çalışmada; likopen uygulamasının başlangıcındaki (4. hafta) ve çalışmanın sonundaki (8. hafta) açlık kan glikoz değerlerinin kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda diyabet+mısır

yağı ile diyabet+likopen gruplarının açlık kan glikoz değerleri kıyaslandığında ise, istatistiksel açıdan bir fark olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızda ulaşılan bu sonuç, diğer çalışmalarla paralellik göstermemektedir. Bu farklılığın nedeninin uygulanan likopen dozu ile deney süresi gibi parametrelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.3. Östrus Siklusunun Değerlendirilmesi

Diyabetin menstrual ve östrus siklusu üzerine etkileriyle ilgili birçok çalışma bildirilmiştir. Snajderová ve ark (1999), diyabetik kadınların %27,9'da düzensiz menstrual siklusun gözlemlendiğini ve menstrual siklus düzensizliğinin kontrolü sağlanamamış diyabetik tablo ile bağlantılı olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer olarak; Adcock ve ark (1994), menstrual düzensizliğin kontrollere göre, zayıf glisemik kontrol gösteren ve kilo artışı olan tip 1 diyabetli hastalarda daha yaygın olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca düzensiz siklus gösteren hastaların %77'sinde polikistik ovarian değişikliklerin bulunduğunu da bildirmişlerdir. Bunların yanında; Karimova (1983), diyabet hastalarının %33'ünün bozulmuş menstrual siklusa sahip olduğunu, düzenli menstrual siklus gösteren kadınların ise; bütün siklik fazlarda kan östrodiol düzeyinin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir. Ayrıca ovaryum fonksiyon bozukluğunun klinik belirtilerinin derecesinin diyabetin şiddetine bağlı olduğunu vurgulamıştır.

Gaete ve ark (2010), tip 1 diyabetik kadınların daha uzun menstrual siklusa sahip olduklarını, oligomenore ve amenorenin kontrollere göre tip 1 diyabetli kadınlarda daha yaygın olduğunu saptamışlardır. Benzer olarak; Strotmeyer ve ark (2003), tip 1 diyabetli kadınlarda uzun siklus ve uzun menstruasyon gibi menstrual problemlerin daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca tip 1 diyabetli kadınlarda daha geç menarş, daha erken menapoz, daha az gebelik ve daha fazla ölü doğumun görüldüğü tespit edilmiştir.

Valdes ve ark (1990), hipotalamik gonadotropin serbestleyici hormon (GnRH) konsantrasyonunun diöstrus dönemindeki kontrol ratlara göre diyabetik ratlarda önemli ölçüde daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Cox ve ark (1994) ise; diyabetik domuzların normal domuzlara göre daha yüksek LH ve daha düşük östrojen değerlerine sahip olduklarını tespit etmişler. Ayrıca normal domuzlar düzenli östrus siklusu sergilerken diyabetik domuzların sikluslarının düzenli olmadığını ya da ovulasyonda problem yaşadıklarını bildirmişlerdir. Bunların yanında; Garris ve ark (1982), diyabetik

hamsterlarda medial-bazal hipotalamusta sinir hücrelerinin azaldığını ve bütün diyabetik hamsterların asiklik olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca korpus luteumlardaki luteal hücrelerde lipid miktarının azaldığını bunun da muhtemelen serum progesteron seviyelerindeki azalma ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Diğer taraftan; Taniguchi ve ark (1984), diyabetik ratların sabit olarak diöstrus gösterdiklerini, ovulasyon sayısı ile ovaryum ve uterus ağırlıklarının kontrol ratlara göre önemli ölçüde az olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan incelemede; kontrol gruplarına ait ratların düzenli olarak östrus siklusunun evrelerini izledikleri tespit edildi. Diyabet gruplarındaki ratlarda ise, siklus evrelerinin düzensiz olarak devam ettiği ve birçok ratın bir haftalık sürecin büyük bir bölümünde özellikle diöstrus döneminde bulundukları saptandı. Bu bulgular; Taniguchi ve ark (1984)'nın çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Çalışmamız ile diyabetin etkisiyle ratlarda östrus siklusunun bozulduğu doğrulanmış ve diyabetli hayvanlara verilen likopenin siklusun düzenlenmesinde rolünün olmadığı gözlenmiştir.

4.4. Ovaryum

4.4.1. Histolojik Değerlendirmeler

Diyabetin ovaryum histolojisine yönelik etkileri çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir. Garris ve ark (1985), kontrol farelere göre C57BL/KsJ diyabetik farelerin ovaryumlarında, kayda değer derecede stromal ve foliküler dejenerasyon ile belirgin bir atrofinin olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda ovaryum histopatolojik açıdan incelendiğinde; kontrol gruplarına kıyasla diyabet gruplarında korpus luteumlarda daha fazla miktarda vakuol bulunduğu ve intersitisyel alanlarda hidropik dejenerasyon alanlarının artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, diyabetin ovaryumda çeşitli yapısal bozukluklara yol açtığını teyit etmektedir. Ayrıca çalışmamızda likopenin ovaryum yapısındaki histopatolojik bozuklukları düzeltmede etkisinin olamadığı da saptanmıştır. Bunlara ek olarak; Liebhart ve Szamborski (1974) ise; alloksan ile diyabet oluşturulan dişi diyabetik tavşanlarda üreme sisteminde kapiller damarların bazal membranlarının aşırı derecede kalınlaştığını gözlemişlerdir. Tatewaki ve ark (1989) ise, diyabetik NOD farelerin ovaryumlarındaki granüloza hücrelerinde lipid damlacıklarının konsantrasyonlarında bir artış tespit etmişlerdir. Benzer şekilde; Garris ve ark (1986)'nın çalışmasında, kontrol

gruplarına kıyasla diyabetik farelerde ovaryumun granüloza, teka ve stromal hücrelerinde hücre içi lipid birikintilerinin arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmaların aksine; Garris ve ark (1982); diyabetik hamsterlarda serum progesteron seviyelerinin azaldığını saptamışlardır. Ayrıca bu bulguyla ilişkili olarak; kontrollere göre diyabetik hayvanlarda korpus luteumdaki luteal hücrelerde lipid miktarının azaldığı belirlenmiştir.

Diyabet tablosunda, ovaryumdaki folikül ve korpus luteum sayıları incelenmiş ve birbirine benzer sonuçlar ortaya konmuştur. Garris (1984) çalışmasında; kontrol hamsterlara kıyasla hem orta düzey (160-350 mg/dl kan glikozu), hem de yüksek düzey (≥ 350 mg/dl kan glikozu) diyabetik hamsterlarda toplam primer ve sekonder folikül sayısında azalma saptamıştır. Ayrıca kontrollere göre yüksek düzey diyabetik hayvanlarda canlı folikül oranının sekonder foliküllerde büyük ölçüde azaldığını, canlı tersiyer folikül sayısında önemli bir değişim olmadığını ve atretik ile sekonder folikül yüzdesinin ise büyük ölçüde arttığını dile getirmiştir. Benzer olarak; Chang ve ark (2005) da; kronik diyabetli Akita farelerinde ovaryumlarda görülen büyük, antral, orta/küçük foliküller ile korpus luteum sayılarının kontrol farelere göre daha az olduğunu belirlemişlerdir. Bunların yanında; Shima ve ark (2011), STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda ovaryumlarda primordial, primer, sekonder ve tersiyer folikül sayılarının azaldığını, aksine atretik folikül sayısının ise arttığını saptamışlardır. Ayrıca Barmak ve ark (2013) da; STZ ile diyabet oluşturulan gebe ratlarda gebeliğin 18. gününde fötüslerden elde edilen ovaryumlarda toplam primordial cinsiyet hücre sayısının azaldığını saptamışlardır. Çalışmamızda ovaryumdaki folikül ve korpus luteum sayıları incelendiğinde ise; primordial, primer, sekonder, küçük antral ve büyük antral folikül sayılarında gruplar arasında anlamlı bir değişiklik görülmezken; korpus luteum sayısının kontrol+mısır grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca diyabet+mısır yağı grubunda atretik folikül sayısının kontrol+mısır yağı grubuna göre dikkat çekici bir biçimde arttığı da saptanmıştır. Söz konusu çalışmalarda diyabetli hayvanlarda gelişmekte olan foliküllerin sayılarının azaldığı bildirilirken; sunulan çalışmada kontrol gruplarıyla farklılık göstermediği dikkati çekmiştir. Çalışmamızda ovaryum örnekleri diöstrus döneminde alınırken, yukarıda bahsi geçen çalışmalarda ovaryum örneklerinin östrus siklusunun hangi evresinde alındığı bildirilmemiştir. Bu durum östrus siklusu farklılıklarının göz ardı edilmiş olabileceğini akla getirmektedir ve bu sebeple farklı sonuçlar elde edilmiş olabilir. Bunun yanında; kontrollere göre diyabetli hayvanlarda

korpus luteum sayılarındaki artış, diyabetli hayvanların östrus sikluslarının bozulmuş olması ve ovulasyon sonrası korpus luteum oluşumunun gerçekleştiği diöstrus dönemine takılı kalmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu bulgu çalışmamız ile ilk kez ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmamızda diyabetik hayvanlara uygulanan likopenin etkisiyle ovaryumdaki folikül ve korpus luteum sayılarında bir değişiklik olmadığı da saptanmıştır.

4.4.2. Histometrik Değerlendirmeler

Çeşitli çalışmalarda diyabet tablosunun ovaryumda histometrik ölçümler üzerine etkileri ifade edilmiştir. Chang ve ark (2005), kronik diyabetli Akita farelerinde kontrol farelere göre daha küçük ve orta boyutta foliküllerin bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak; Shima ve ark (2011), STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda sekonder ve tersiyer folikül çaplarının azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca Cox ve ark (1994), STZ ile diyabet oluşturulan domuzlarda kontrollere göre foliküler çapın daha küçük olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda ovaryumdaki foliküllerin çap ölçümleri incelendiğinde ise; bahsi geçen çalışmalara (Chang ve ark 2005, Shima ve ark 2011, Cox ve ark 1994) benzer şekilde, kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda primordial, primer ve sekonder folikül çaplarında istatistiksel açıdan önemli olmasada bir azalma tespit edilmiştir. Diyabetik hayvanlarda özellikle küçük foliküllerdeki bu bulgular, diyabetin folikül gelişimi üzerine olumsuz etkiye sahip olabileceğini akla getirmektedir. Bununla birlikte; çalışmamızda kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda korpus luteum çapının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgu sunulan çalışmayla ilk kez ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmamızda likopenin diyabetli hayvanlarda folikül ve korpus luteum çapları üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı da görülmüştür.

4.4.3. Konneksin-43 Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Diyabetik ratlarda yapılan çalışmalarda; diyabetin rat kalbinde (Okruhlicova ve ark 2002, Lin ve ark 2006) ve idrar kesesinde (Poladia ve ark 2005) konneksin-43 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Bunların aksine; bazı çalışmalarda ise, diyabetli hayvanların penil dokusunda (Chen ve ark 2008) ve kalp ventriküllerinde konneksin-43 ekspresyonunun kontrollerden farklı olmadığı ifade edilmiştir (Howarth ve ark 2008).

İn vitro çalışmalarda ise; yüksek glikoz içeren medyunda bulunan rat retinal endotelyal hücrelerinde konneksin-43 protein ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı (Tien ve ark 2013), benzer olarak; diyabetik farelerden elde edilen kumulus hücreleriyle kaplı oositlerde de konneksin ekspresyonunun azaldığı ifade edilmiştir (Ratchford ve ark 2008). Çalışmamızda ise; kontrol gruplarına göre diyabet+mısır yağı grubunda ovaryumda bazı parametrelerde istatistiksel olarak önemli olmak kaydıyla konneksin-43 boyanma yoğunluğunun azaldığı saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen farklı hücre ve dokular üzerine yapılan çalışmalarda, konneksin-43 ekspresyonu ile ilgili elde edilen sonuçlar ovaryum içinde geçerli olup çalışmamızla paralellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada; Kuroki ve ark (1998), protein kinaz C aktivasyonunun aracılık ettiği konneksin-43'ün aşırı fosforilasyonu, vasküler düz kas hücrelerinde yüksek glikozun gap junction aktivitesinin baskılanmasına yol açtığını bildirmişlerdir. Bu bulguya dayalı olarak; diyabetin etkisiyle önemli bir gap junction proteini olan konneksin-43'ün ekspresyonunun ovaryumda azalmış olabileceği düşünülebilir. Bu sebeple oosit olgunlaşması ve folikül gelişimi olumsuz etkilenebilir.

Tümör hücre hatlarında yapılan çalışmalarında; likopen uygulamasının hücrelerdeki konneksin-43 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı (Fornelli ve ark 2007, Livny ve ark 2002) aksine prostat kanser hücrelerinde konneksin-43 protein düzeyini değiştirmedeği bildirilmiştir (Ford ve ark 2011). Çalışmamızda ise; diyabetik ratlara likopen uygulamasıyla ovaryumda konneksin-43 yoğunluğunun atretik folikül dışında bütün parametrelerde arttığı, ayrıca bu artışın primordial, sekonder ve büyük antral foliküllerde istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda; likopenin diyabet tablosunda lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Yue ve ark 2006, Aydın ve Çelik 2012, Duzguner ve ark 2008). Ayrıca likopen yaygın olarak hücre zarlarında yerleşim gösterir ve membran lipidlerine karşı oksidatif hasarın önlenmesinde görev alarak membranların akıcılığının, sağlamlığının ve kalınlığının sağlanmasına katkı sağlar (Duzguner ve ark 2008). Bunların yanında; Zhang ve ark (1992) ise, likopeni de içine alarak karotenoidlerin, konneksin-43'ün hem protein hem de mRNA düzeylerini arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca çalışmamızda, likopenin etkisiyle diyabetik ratların ovaryumunda MDA düzeyinin istatistiksel olarak önemli olmasada azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgulara dayalı olarak, likopenin diyabetik hayvanlarda hücre membranlarını oksidatif hasara karşı koruyabileceği ve konneksin-43'ün transkripsiyon ile translasyonunu

arttırabileceği akla gelmektedir. Böylece diyabet tablosunda likopenin etkisiyle hücreler arası bağlantı birimlerinden olan gap junctionlar ile sağlanan hücre-hücre iletişiminin düzenlenmesinde rol oynayan konneksin-43'ün ekspresyonunun artmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte; çalışmamız ile diyabetik hayvanlarda likopen kullanımının ovaryumda konneksin-43 ekspresyonu üzerine etkisi ilk kez belirlenmiştir.

4.4.4. Apoptotik Hücre Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Yapılan çeşitli çalışmalarda erkek ve dişi genital organlarda diyabetle ilişkili apoptozisten bahsedilmektedir. Chang ve ark (2005)'nın çalışmasında akut ve kronik diyabet modellerinde, farelerin ovaryumlarında kontrollere göre TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı saptanmıştır. Ayrıca kontrol grubu hayvanlara kıyasla diyabetik farelerde kumulusla çevrili oositlerde, TNF ilişkili apoptosis indükleyici ligand (TRAIL) ve onun reseptörü olan KILLER ekspresyonlarında da artış görüldüğü bildirilmiştir. Benzer olarak; Wang ve ark (2010), kontrollere kıyasla diyabetik farelerdeki kumulus hücrelerinde apoptotik hücre oranının önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda; büyük antral foliküllerin granüloza katmanlarındaki ve korpus luteumlardaki apoptotik hücre sayılarının kontrol+mısır yağı grubuna göre diyabet+mısır yağı grubunda yüksek olduğu görülürken, büyük antral foliküllerdeki apoptotik hücre sayısındaki artışın istatistiksel olarak da önemli olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulgular yukarıdaki çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ayrıca likopenin etkisiyle diyabetli hayvanların ovaryumunda apoptotik hücre sayısının azaldığı belirlenmekle birlikte; bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı da görülmüştür.

4.4.5. Malondialdehid Düzeyinin Değerlendirilmesi

Tip 2 diyabet hastalarında plazma MDA konsantrasyonu (Škrha ve ark 1996) ile eritrosit lipid peroksidasyonunun (Memisogullari ve ark 2003) sağlıklı insanlara göre artış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca iyi metabolik kontrollü tip 2 diyabet hastalarına göre zayıf metabolik kontrollü tip 2 diyabet hastalarının plazma MDA değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Altomare ve ark 1992). Benzer olarak; nöropati komplikasyonu bulunan tip 2 diyabet hastalarında MDA düzeyinin, nöropati komplikasyonu olmayanlara göre daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Bhatia ark ve 2003). Bunların yanında; gestasyonel diyabetli kadınlarda maternal ve göbek kordonundan elde edilen plazma

MDA değerlerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Madazlı ve ark 2008).

Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan çalışmalarda; ratlarda testis (Armagan ve ark 2006), hipokampus, beyin kabuğu, beyincik, beyin kökü, omurilik (Ateş ve ark 2006), karaciğer ve böbrekte (Kumar ve Menon 1992) MDA düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada; ovaryum dokularından elde edilen MDA değerleri incelendiğinde ise, yukardaki çalışmalarla paralel olarak kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında MDA değerinin önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir.

Diyabete karşı likopen kullanımı ile ilgili çalışmalarda; 3 ay boyunca günde bir kez 4 mg/kg oral likopen kullanımının kan örneklerinde MDA düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (Singh ve ark 2012). Benzer olarak; 8 hafta boyunca 10 mg/kg, 30 mg/kg ve 60 mg/kg likopen kullanımının ise korpus kavernozumda MDA düzeyini diyabetlilere göre azalttığı bildirilmiştir (Gao ve ark 2012). Bunların aksine; likopen uygulamasıyla diyabetik hayvanların kan (Aydın ve Çelik 2012), beyin, karaciğer, böbrek ve dalak örneklerinde (Duzguner ve ark 2008) MDA düzeylerinin değişmediği de ifade edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise; diyabetli hayvanlara likopen uygulamasının ovaryumdaki MDA düzeyini istatistiksel olarak önemli olmasada düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca deneysel diyabet oluşturulan ratlarda ovaryum örneklerinde MDA düzeyi belirlenmiş ve likopenin ovaryumda MDA düzeyine etkisi çalışmamızla ilk kez ortaya konmuştur.

4.5. Uterus

4.5.1. Histolojik Değerlendirmeler

Diyabetin uterus histopatolojisine yönelik etkileri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Garriss ve Smith (1983), diyabetik hamsterlarda uterus epitelinin mikrovillustan ve salgısal aktiviteden yoksun olduğunu, epitel altındaki bazal laminanın 2-5 defa daha kalın olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, endometriyumun yapısının bozulduğunu ve kalınlaşmış bir interselüler matriks tarafından sarılmış, yuvarlak hücrelerden oluştuğunu saptamışlardır. Bunun yanında; Garriss (1988), diyabetik ratlarda uterus ağırlığının ve uterus kan akımının azaldığını tespit etmiştir. Ayrıca Garriss ve ark (1984), diyabetik hamsterların uterusunda çok sayıda stromal hücrenin sitoplazmik vakuolizasyon sergilediğini ifade etmişlerdir. Garriss (2004), Tatewaki ve ark (1989) ve Garriss ve ark (1986)'nın çalışmalarında ise;

kontrol gruplarına göre diyabetik hayvanlarda uterusun luminal ve glandular epitelinde lipid birikiminin arttığı saptanmıştır. Çalışmamızda, kontrol gruplarına kıyasla diyabet gruplarında endometriyumda bez sayılarının önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ve bu bulgu Garris ve Smith (1983)'in çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Bu sonuca dayalı olarak; diyabet tablosu ile uterustaki salgı aktivitesinin değişebileceği düşünülebilir. Ayrıca çalışmamızda likopenin diyabetik hayvanlarda endometriyumdaki bez sayısını istatistiksel olarak önemli olmasada arttırdığı belirlenmiştir.

4.5.2. Histometrik Değerlendirmeler

Çeşitli çalışmalarda diyabet tablosunun uterusu histometrik ölçümler üzerine etkileri belirtilmiştir. Garris ve Smith (1983), diyabetik hamsterlarda uterus yüzey epitel yüksekliğinde azalmanın olduğunu tespit etmiştir. Diğer taraftan; Garris ve ark (1984), diyabetik hamsterların uterusunda bez lumenlerinin kapalı olduğunu gözlemişlerdir. Tatewaki ve ark (1989) ve McMurtrie ve ark (1985)'nin çalışmalarında ise; kontrol grubuna göre diyabetik hayvanların miyometriyumunda atrofi olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda uterustaki histometrik ölçümler incelendiğinde ise; kontrol+mısır yağı ile diyabet+mısır yağı grupları arasında yüzey ve bez epitel yüksekliklerinde literatür verilerinin aksine önemli bir değişikliğin olmadığı, bez alanı ve endometriyum kalınlığı açısından ise; diyabet gruplarında kontrollere göre anlamlı bir azalmanın gözlemlendiği belirlenmiştir. Diyabetik hayvanlarda bez alanı ve endometriyum kalınlığı ile ilgili bulgular sunulan çalışmayla ilk kez ortaya konmuştur. Bu sonuçlara dayalı olarak; diyabet tablosunda uterustaki salgının miktarının azalabileceği ve dokuda yapısal bir atrofının şekillendiği dikkati çekmektedir. Ayrıca çalışmamızda likopenin diyabetli hayvanlarda uterus histometrisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı da görülmüştür.

4.5.3. Histokimyasal Değerlendirmeler

4.5.3.1. PAS reaksiyonunun değerlendirilmesi

Çalışmamızda uterusun PAS yöntemi ile boyanma özelliği incelendiğinde; yüzey ve bez epitel hücrelerinin apikal bölümlerinde PAS pozitif granüllerin varlığı saptanmıştır. Ayrıca yüzey epitel hücrelerinin altındaki bazal membranın da PAS pozitif boyandığı görülmüştür. Bununla birlikte; endometriyum ve miyometriyumun kas katmanları

arasındaki bağ dokuda PAS pozitif hücrelerin olduğu gözlenmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda; Larsen (1962), östrus döneminde tavşanlarda uterus epitelinin bazal membranının ve fırça kenara sahip silli olmayan hücrelerin luminal sitoplazmalarının PAS pozitif aktiviteye sahip olduğunu, silli hücrelerde ise reaksiyon görülmediğini bildirmiştir. Ovariectomize tavşanlarda ise; uterus epitelinde PAS pozitif reaksiyonun kaybolduğu görülmüştür. Mayor ve ark (2004) ise, pekari serviks epitelinin salgısal ve silyalı prizmatik hücrelerden oluştuğunu, PAS pozitif salgı hücrelerinin miktarının ise, foliküler fazdaki hayvanlara göre luteal fazdaki ve gebe olan hayvanlarda daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer olarak; Pluta ve ark (2011) da, sığırlarda serviks epitelinde nötral musinlerin hücrede apikal bölüme göre bazal bölümde daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan; Zhang ve ark (2009), Wang ve ark (2003) ve Wang ve ark (2000)'ın yaptıkları çalışmalarda; uterusu doğal katil/öldürücü hücrelerin (Naturel Killer Cell) PAS pozitif sitoplazmik granüllere sahip olduğu bildirilmiştir. Wick ve Kress (2002)'in çalışmasında ise; keseli sıçanın endometriyal stromasında makrofajların çoğu durumda PAS pozitif reaksiyon gösterdikleri belirlenmiştir. Çalışmamızda ise; uterus yüzey epitelindeki PAS pozitif reaksiyonun ve endometriyum stromasındaki PAS pozitif hücre sayısının kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığı saptanmıştır.

Bez epiteline yönelik çalışmalarda ise; Noci ve ark (1995), insan uterus endometriyumunda glandular epitel hücre tabanında PAS pozitif, ince dağınık bir glikojen birikiminin olduğunu tespit etmişlerdir. Santos ve ark (2012) ise; pekari uterusundaki bezlerin gebelik döneminde yoğun PAS pozitif olduklarını bildirmişlerdir. Bunların yanında; Witte ve ark (2012) da; N-asetilsistein ile tedavi edilen köpeklerin uterus bezlerinde PAS pozitif skorun kontrol gruplarına göre önemli ölçüde yüksek olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda ise; uterus bez epitelindeki PAS pozitivitesinin kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır.

Yapılan literatür incelemesinde uterusu diyabetin PAS reaksiyonuna etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamış olup; çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgularla diyabetik hayvanların uterusunda PAS aktivitesindeki değişimler ilk kez ortaya konmuştur. Böylece, diyabetin etkisiyle uterus bez epitelinde nötral musinlerin azaldığı belirlenmiştir. Endometriyum stromasındaki PAS pozitif hücrelerin ise; literatürlere dayanarak doğal

katil/öldürücü hücreler ya da makrofajlar olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca likopenin diyabetli hayvanlarda uterustaki PAS aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı da görülmüştür.

4.5.3.2. Alcian blue pH: 2,5 reaksiyonunun değerlendirilmesi

Uterusta Alcian blue reaksiyonu, yapılan çeşitli çalışmalarda tanımlanmıştır. Wick ve Kress (2002), keseli sıçan uterusunda luminal epitelin silli olmayan hücrelerinin salgı aktivitesinin apikal membran boyunca belirgin olduğunu ve Alcian blue ile zayıf boyandığını belirlemiştir. Glandular epitel hücrelerinin ise; apikal bölümlerinde östrus ve proöstrus dönemlerinde AB pozitif ekzositotik veziküllerin bulunduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda uterusun Alcian blue pH: 2,5 yöntemi ile boyanma özelliği incelendiğinde; yüzey ve bez epitel hücrelerinin luminal sınırlarında AB pozitif reaksiyonun olduğu görüldü. Bu bulgular yukarıdaki çalışmayla paralellik göstermektedir. Bununla birlikte; çalışmamızda uterus bez epitelindeki AB pozitif aktivitenin kontrol gruplarına göre diyabet gruplarında anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. Bu bulgular ışığında; diyabetin etkisiyle uterus bez epitelinde asidik mukosubstansın arttığı dikkati çekmektedir. Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgularla, diyabetik hayvanların uterusunda AB aktivitesindeki değişimler ilk kez ortaya konmuştur. Diğer taraftan; likopenin diyabetli hayvanlarda uterustaki AB aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı da görülmüştür.

4.6. Vajina

4.6.1. Histolojik Değerlendirmeler

Diyabetin vajina histopatolojisine yönelik etkileri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Park ve ark (2001), kontrole göre diyabetik hayvanlarda; vajinal submukozada vaskülaritenin azaldığını, kollajen bağ dokunun ise; yoğun, düzensiz ve biçimsiz olduğunu saptamışlardır. Benzer olarak; Ferrini ve ark (2006), diyabetik ratların vajinasında; kollajen miktarının ve apoptozis oranının arttığını, α -düz kas aktin'in ise azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca Lee ve ark (2012) ve Kim ve ark (2006b), diyabetik ratlarda vajinal kan akımının azaldığını saptamışlardır. Bununla birlikte; Park ve ark (2002), kontrollere göre alloksan ile diyabet oluşturulan tavşanlarda; klitoriste yaygın kavernoza fibrozis'in mevcut

olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda vajina histopatolojik açıdan incelendiğinde ise; diyabet gruplarındaki kesitlerde lamina epiteliyalis içinde çeşitli büyüklüklerde vakuollerin olduğu gözlenmiştir. Bahsi geçen araştırmalara paralel olarak; çalışmamız ile diyabetin vajinada çeşitli yapısal bozukluklara sebep olduğu teyit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda likopenin vajina yapısındaki histopatolojik bozuklukları düzeltmede etkisinin olmadığı da saptanmıştır.

4.6.2. Histometrik Değerlendirmeler

Diyabetin vajina histometrisi üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda (Park ve ark 2001 ve Park ve ark 2002), Cushman ve ark (2009a), Kim ve ark (2006b), kontrole göre diyabetik hayvanlarda, vajina epitelinin ve muskularis katmanının incelendiği saptanmıştır. Ayrıca Park ve ark (2001) diyabetin vajinada fibrozise yol açtığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada vajinadaki histometrik ölçümler incelendiğinde yukarıdaki çalışmalara paralel bulgular elde edilmiştir. Bu sonuçlara dayalı olarak; diyabet tablosunda vajinada yapısal bir atrofinin şekillendiği görülmektedir. Ayrıca çalışmamızda, diyabetik hayvanlarda likopenin etkisiyle lamina epiteliyalis yükseklikleri açısından önemli bir değişiklik görülmezken; tunika muskularis kalınlığında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda; Zhou ve ark (2008), likopenin akciğerlerde fibrozisi kısmen azalttığını tespit etmişlerdir. Türkoğlu ve ark (2012) ise, likopenden zengin diyetin akciğer hasarının önlenmesinde önemli role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Bahcecioglu ve ark (2010) likopenin deneysel steatohepatitis modelinde steatoz ve inflamasyon oranını azalttığını belirlemişlerdir. Ayrıca Ateşşahin ve ark (2007) siklosporin ile oluşturulan böbrek fonksiyon bozukluğunda; likopen tedavisinin tübüler nekroz, dejenerasyon, kalınlaşmış bazal membran ve tübüller arası fibrozis gibi patolojik değişiklikleri iyileştirdiğini saptamışlardır. Bunların yanında; Ferreira ve ark (2007) doksorubisin ile oluşturulan kardiyak toksisitede, likopenin miyosit hasarını azalttığını tespit etmişlerdir. Yue ve ark (2012) ise, likopenin hipoksi/reoksijenizasyon ile oluşturulan kalp kası hücrelerindeki apoptozis oranını azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Bansal ve ark (2006) iskemi-reperfüzyon hasarından sonra oluşan miyokardiyal hasarın likopen ile tedavi edilen grupta önemli ölçüde azaldığı belirlemişlerdir. İfade edilen bu bulgulara dayanarak; likopenin vajinada fibrozis, apoptozis ve dejenerasyon oranını azaltarak diyabete bağlı

oluşan vajinal atrofinin önlenmesinde kısmi olumlu bir etkiye sahip olabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte; bu bulgu çalışmamız ile ilk kez ortaya konmuştur.

4.6.3. PAS Reaksiyonunun Değerlendirilmesi

Sunulan çalışmada vajinanın PAS yöntemi ile boyanma özelliği incelendiğinde; lamina epiteliyalisteki yüzeye yakın birkaç kat epitel hücresinin PAS pozitif reaksiyon gösterdiği saptanmış olup, bu bulgu yapılan çalışmalarla (Flamini ve ark 2012, Lasnitzki 1961) paralellik göstermektedir.

Vajinada diyabet tablosunun PAS reaksiyonuna etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmazken, androjenlerin vajinadaki PAS aktivitesiyle ilişkisi bildirilmiştir. Groot ve ark (1989)'nın çalışmasında; siklik düvelere sentetik bir androjen olan trenbolon asetat uygulanmış ve vajinanın yüzey epitel katmanında PAS pozitif granüllerin arttığı belirlenmiştir. Henriques ve ark (2011) ise; ovariectomize ratlarda sentetik bir steroid olan tibolon'un vajina üzerine etkisini incelemişler ve tibolon grubu bütün hayvanlarda PAS pozitivitesinin intraepitelyal lökositlerde ve keratohyalin granüllü yüzeysel epitel hücrelerinde görüldüğünü belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise; lamina epiteliyaliste PAS pozitif aktivitenin kontrol+likopen grubuna göre, diyabet+mısır yağı ile diyabet+likopen gruplarında anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu diyabetin etkisiyle vajina lamina epiteliyalisindeki hücrelerde nötral musinlerin arttığını göstermektedir. Bununla birlikte; çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgularla diyabetik hayvanların vajinasında PAS aktivitesindeki değişimler ilk kez ortaya konmuş ve likopenin diyabetik hayvanların vajinasındaki PAS aktivitesi üzerinde bir değişime yol açmadığı saptanmıştır.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada; diyabetik ratlarda likopenin yüksek açlık kan glikoz değerleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Diyabet gruplarındaki ratlarda, östrus siklusu evrelerinin düzensiz olarak devam ettiği ve ratların büyük ölçüde diöstrus döneminde bulundukları saptandı. Likopenin ise, östrus siklusunun düzenlenmesinde etkili olmadığı belirlendi.

Ovaryumda yapılan incelemelerde; diyabetin etkisiyle korpus luteum vakuolizasyonunun, intersitisyel alanlardaki hidropik dejenerasyonun ve korpus luteum sayılarının arttığı, buna karşın korpus luteum çaplarının azaldığı belirlendi. Diyabetli hayvanlara verilen likopenin ise; ovaryumdaki histopatolojik değişikliklerin önlenmesinde ayrıca folikül sayıları ve çapları üzerine önemli bir etkisinin olmadığı saptandı. Diyabetik hayvanların ovaryumlarında primordial ve atretik foliküller, korpus luteumdaki luteal hücreler ile intersitisyel hücrelerde konneksin-43 ekspresyonunun azaldığı saptandı. Likopen uygulanan diyabetik hayvanlarda ise; primordial, sekonder ve büyük antral foliküllerde konneksin-43 ekspresyonunun arttığı görüldü. Diğer taraftan; diyabetik hayvanlarda ovaryumdaki MDA düzeyinin ve büyük antral foliküllerin granüloza katmanlarındaki apoptotik hücre sayısının daha yüksek olduğu saptandı. Diyabetik hayvanlara uygulanan likopenin ise, ovaryumda MDA düzeyini ve apoptotik hücre sayısını azalttığı tespit edilmekle birlikte, bu etkilerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Uterusta yapılan incelemelerde; diyabetin etkisiyle bez sayısının, endometriyum kalınlığının ve bez epitellerindeki PAS pozitivitesinin azaldığı, aksine bez epitellerindeki AB pozitivitesinin ise; arttığı tespit edildi. Ayrıca diyabetli hayvanlara verilen likopenin uterusda histometrik ve histokimyasal açıdan önemli bir değişime sahip olmadığı saptandı. Vajinada yapılan incelemelerde ise; diyabet tablosuyla lamina epiteliyalis yüksekliğinin ve tunika muskularis kalınlığının azaldığı tespit edildi. Diğer taraftan; diyabet+likopen grubunda tunika muskularis kalınlığının arttığı saptandı.

Sunulan çalışma ile; diyabete bağlı dışı genital sistem organlarında tespit edilen değişikliklerin bir bölümü ilk kez belirlenmiş ve bu değişiklikler üzerine bazı parametrelerde likopenin koruyucu etkilerinin varlığı ilk kez ortaya konmuştur. Bununla

birlikte; likopen dozu ve uygulama süresini artırarak yapılacak çalışmaların dişi genital sistemde likopenin antioksidan etkisini daha ayrıntılı ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

ÖZET

Sunulan çalışmada; deneysel diyabet oluşturulan ratlarda dişi genital sistem organlarında meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi ve oral olarak verilen likopenin bu değişiklikler üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Araştırmada; 30 adet erişkin dişi Wistar Albino ırkı rat (ortalama 160 g / 4 aylık) kullanıldı. Tek doz 50 mg/kg streptozotosin (STZ) 0,01 M sitrat tamponu pH: 4,5 içerisinde intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanarak deneysel diyabet oluşturuldu. Streptozotosin uygulamasından 3 gün sonra açlık kan glikoz düzeyi 250 mg/dl ve üzerinde olan ratlar çalışmaya dahil edildi. Streptozotosin ile diyabet oluşturulduktan 3 hafta sonra kontrol ve diyabetik ratlar kontrol+mısır yağı (n=6), kontrol+likopen (n=6), diyabet+mısır yağı (n=8) ve diyabet+likopen (n=10) olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı.

Kontrol+likopen ve diyabet+likopen gruplarındaki ratlara gavaj yoluyla 4 hafta boyunca her gün 4 ml/kg mısır yağında çözündürülerek 4 mg/kg likopen verildi. Kontrol+mısır yağı ve diyabet+mısır yağı gruplarındaki ratlara ise; hergün 4 ml/kg mısır yağı verildi. Likopen uygulamasının son haftasında bütün gruplarda yer alan hayvanların düzenli östrus siklusu gösterip göstermedikleri vajinal smear yöntemi ile belirlendi.

Çalışmanın başlangıcında ve sonunda (8. hafta) tüm gruplardaki ratların vücut ağırlıkları ölçüldü. Açlık kan glikoz değerleri ise, çalışmanın başlangıcında, likopen uygulamasının başında (4. hafta) ve çalışmanın sonunda (8. hafta) tespit edildi. Çalışmanın sonunda diöstrus dönemindeki hayvanlar hafif eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Hayvanlardan sağ ovaryum, uterus ve vajina örnekleri alındı ve % 4'lük paraformaldehit'te tespit edildi. Ardından rutin histolojik takip serilerinden geçirilen dokular paraplasta gömülerek, 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Sol ovaryum ise, sıvı nitrojende dondurulup -80 °C'de saklandı.

Hazırlanan tüm doku kesitlerine histolojik ve histometrik incelemeler için Crossman'ın üçlü boyama yöntemi uygulandı. Bunun yanında; ovaryumda immunohistokimyasal olarak konneksin-43 ekspresyonu, TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) yöntemiyle apoptotik hücre yoğunluğu ve ELISA tekniğiyle malondialdehid (MDA) düzeyi saptandı. Ayrıca

histokimyasal incelemeler için ovaryum, uterus ve vajinaya Periyodik Asit Schiff (PAS), uterusa ise; Alcian Blue (AB) pH: 2,5 yöntemleri uygulandı.

Sunulan çalışmada; diyabetik ratlarda likopenin yüksek açlık kan glikoz düzeyi üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca diyabetik ratların düzensiz östrus siklusuna sahip oldukları tespit edildi. Ovaryumda; diyabetin etkisiyle korpus luteum vakuolizasyonunun, intersitisyel alanlardaki hidropik dejenerasyonun ve korpus luteum sayılarının arttığı; korpus luteum çaplarının ise, azaldığı belirlendi. Bununla birlikte; diyabet+mısır yağı grubunda ovaryumda primordial ve atretik foliküller, intersitisyel hücreler ve korpus luteumdaki luteal hücrelerde konneksin-43 ekspresyonunun azaldığı saptandı. Diğer taraftan; diyabetin etkisiyle ovaryumdaki MDA düzeyinin ve büyük antral foliküllerin granüloza katmanlarındaki apoptotik hücre sayılarının daha yüksek olduğu tespit edildi. Uterusta; diyabetin etkisiyle bez sayısının, endometriyum kalınlığının ve bez epitelinde PAS pozitif aktivitenin azaldığı, aksine bez epitelinde AB pozitif aktivitenin ise arttığı tespit edildi. Vajinada ise; diyabet tablosuyla lamina epiteliyalis yüksekliğinin ve tunika muskularis kalınlığının azaldığı gözlemlendi.

Diyabetik hayvanlara uygulanan likopenin ovaryumun primordial, sekonder ve büyük antral foliküllerinde konneksin-43 ekspresyonunu arttırdığı saptandı. Ayrıca ovaryumda MDA düzeyini ve apoptotik hücre sayısını azalttığı tespit edilmekle birlikte, bu bulguların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Uterusta ise; diyabetli hayvanlara verilen likopenin histometrik ve histokimyasal açıdan önemli bir değişim oluşturmadığı görülürken; vajinada diyabet+likopen grubunda tunika muskularis kalınlığının arttığı saptandı.

Sonuç olarak; diyabetin etkisiyle dişi genital sistem organlarında tespit edilen değişiklikler ve likopenin koruyucu etkilerinin varlığı bazı parametrelerde ilk kez ortaya konmuştur. Diyabetik hayvanlarda likopen dozu ve uygulama süresini artırarak yapılacak çalışmaların, dişi genital sistemde likopenin antioksidan etkisini daha belirgin ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Deneysel diyabet, konneksin-43, likopen, malondialdehid, ovaryum, rat, TUNEL, uterus, vajina.

SUMMARY

In this study, I have attempted to identify the changes that occurred in the genital system organs of female rats with experimental diabetes and the effects of orally administered lycopene upon these changes.

In the study, 30 adult female Wistar Albino rats (average body weight 160 g / 4 months old) were used. The experimental diabetes was induced using a single dose of 50 mg/kg streptozotocin (STZ) within 0.01 M citrate buffer administered intraperitoneally. Rats with a blood glucose level on an empty stomach of 250 mg/dl or more after 3 days were included in the study. 3 weeks after diabetes was induced using streptozotocin, the control and diabetic rats were randomly separated into 4 groups as follows; control + corn oil (n=6), control + lycopene (n=6), diabetes + corn oil (n=8) and diabetes + lycopene (n=10).

The control+lycopene and diabete+lycopene groups of rats were fed with 4 mg/kg lycopene dissolved in 4 ml/kg corn oil using a gavage for 4 weeks. The control+corn oil and diabetes+corn oil rats were fed with 4 ml/kg corn oil every day. During the last week of the lycopene application, all animals in all groups were tested to see whether they displayed regular oestrus cycles using the vaginal smear method.

At the beginning and end of the study (week 8) the body weights of all the subjects were measured. The blood glucose levels were measured at the beginning of the study, at the beginning of the lycopene application (week 4) and at the end of the study (week 8). At the end of the study, the animals in the dioestrus period were sacrificed by cervical dislocation under light anaesthetics. Samples were taken from the right ovary, uterus and vagina and fixed in 4% paraformaldehyde. After routine histological monitoring series, the tissues were embedded in paraplast and cross sections 5 µm thick were taken. The left ovary was frozen in liquid nitrogen at -80 °C.

All histological and histometric evaluations of tissue cross sections taken were performed using Crossman's triple staining method. Furthermore, the immunochemical connexin-43 expression was identified and the apoptotic cell density was measured using the TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) method, while the malondialdehyde (MDA) levels were measured using the ELISA technique in

ovary. Also, the Periodic Acid Schiff (PAS) method was used in the histochemical examination of the ovary, uterus and vagina and the Alcian Blue (AB) pH: 2.5 method was used to examine the uterus.

In the study, we observed that lycopene had no effect on blood glucose levels in diabetic rats on an empty stomach. However, we identified that diabetic rats had an uneven oestrus cycle. With the effect of the diabetes in the ovary the vacuolisation of the corpus luteum, hydropic degeneration in the interstitial regions and the numbers of corpus luteum increased, while the diameters of the corpus luteum decreased. Furthermore, for the diabetes+corn oil group, a decrease in the connexin-43 expression was observed in the ovary primordial and atretic follicles, interstitial cells and luteal cells of the corpus luteum. On the other hand, with the effect of diabetes an increase was observed in the ovary MDA level and the number of apoptotic cells in the granulosa layers of the large antral follicles. With the effect of diabetes in the uterus, it was observed that the number of glands, endometrium thickness and PAS positive activity in the gland epithelia decreased, while the AB positive activity in the gland epithelia increased. In the vagina, we observed that diabetes leads to a decrease in the height of the lamina epithelialis and tunica mucularis thicknesses.

It has been identified that lycopene administration in diabetic animals increases the expression of connexin-43 in the primordial, secondary and large antral follicles of the ovary. Furthermore, the MDA level and number of apoptotic cells in the ovary were lower, but found to be not statistically significant. The administration of lycopene in diabetic animals did not lead to any histometric or histochemical changes in the uterus, while the thickness of the tunica muscularis in the vagina increased in the diabetes+lycopene group.

In conclusion, the changes caused by diabetes in the organs of the female genital system and the existence of protective qualities of lycopene in the some parameters was revealed for the first time. We believe that further studies increasing the lycopene dosage and implementation duration for diabetic animals will show that lycopene has a pronounced antioxidant effect on the female genital system.

Keywords: Experimental diabetes, connexin-43, lycopene, malondialdehyde, ovary, rat, TUNEL, uterus, vagina.

KAYNAKLAR

Abraham LK. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Demir R. (Eds). Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. p. 566-584.

Acar A, Akil E, Alp H, Evliyaoglu O, Kibrisli E, Inal A, Unan F, Tasdemir N. Oxidative damage is ameliorated by curcumin treatment in brain and sciatic nerve of diabetic rats. *International Journal of Neuroscience* 2012;122(7):367-372.

Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Developmental Biology* 2001;233(2):258-270.

Adcock CJ, Perry LA, Lindsell DR, Taylor AM, Holly JM, Jones J, Dunger DB. Menstrual irregularities are more common in adolescents with type 1 diabetes: Association with poor glycaemic control and weight gain. *Diabetic Medicine* 1994;11(5):465-470.

Ademiluyi AO, Oboh G. Attenuation of oxidative stress and hepatic damage by some fermented tropical legume condiment diets in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012;5(9):692-697.

Agarwal M, Parameswari RP, Vasanthi HR, Das DK. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules* 2012;17(4):4755-4769.

Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995. p. 1-70.

Alan E, Liman N. Postpartum dönemde sıçan uterusundaki yapısal değişiklikler. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2011;20(2):83-91.

Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 2009;69(3):371-379.

Alireza S, Leila N, Siamak S, Mohammad-Hasan KA, Behrouz I. Effects of vitamin E on pathological changes induced by diabetes in rat lungs. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2013;185(3):593-599.

Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabetes & Metabolism* 1992;18(4):264-271.

Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CJ, Plum F, Smith LH. Cecil essentials of medicine. In: Tuzcu M. (Eds). 3. Baskı. İstanbul: Yüce Yayınları; 1993. p. 513-523.

Aral Y. Endokrinoloji ve metabolizma hastalıklarında temel tedavi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1998. p. 255-328.

Armagan A, Uz E, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian Journal of Andrology* 2006;8(5):595-600.

Ates O, Yucel N, Cayli SR, Altinoz E, Yologlu S, Kocak A, Cakir CO, Turkoz Y. Neuroprotective effect of etomidate in the central nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochemical Research* 2006;31(6):777-783.

Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005;212(2-3):116-123.

Atmaca G. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz ve sarımsak. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2001;2:217-223.

Aydın M, Celik S. Effects of lycopene on plasma glucose, insulin levels, oxidative stress and body weights of streptozotocin-induced diabetic rats. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2012;42 (Sup.2):1406-1413.

Aydın S, Palabiyik SS, Erkekoglu P, Sahin G, Başaran N, Giray BK. The carotenoid lycopene protects rats against DNA damage induced by Ochratoxin A. *Toxicon* 2013;73:96-103.

Bäcklund T, Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Finckenberg P, Kytö V, Lakkisto P, Mervaala E, Voipio-Pulkki LM, Laine M, Tikkanen I. Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodelling after myocardial infarction in experimental diabetes. *Diabetologia* 2004; 47(2):325-330.

Bahcecioglu IH, Kuzu N, Metin K, Ozercan IH, Ustündag B, Sahin K, Kucuk O. Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. *Veterinary Medicine International* 2010;2010(262179):1-8.

Bandeira Sde M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012;2012;819310.

Bánhegyi G. Lycopene--a natural antioxidant. *Orvosi Hetilap* 2005;146(31):1621-1624.

Bansal P, Gupta SM, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, Arya DS. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006;289(1-2):1-9.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *The Journal of Clinical Investigation* 1998;102(4):783–791.

Barmak MJ, Khaksar Z, AsgharSharifi A, Reza Mahmoudi. Effect of Aloe vera extract on ovaries development in during gestational age of 18 day embryo of diabetic rats. *Life Science Journal* 2013;10(2s):323-327.

Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhäusl W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1995;44(11):1323-1327.

Baynes JW. Role of Oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40(4):405-412.

Bayramoglu A, Bayramoglu G, Senturk H. Lycopene partially reverses symptoms of diabetes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Medicinal Food* 2013;16(2):128-132.

Belter A, Giel-Pietraszuk M, Oziewicz S, Chomczyński P, Barciszewski J. Lycopene--occurrence, properties and applications. *Postepy Biochemii* 2011;57(4):372-380.

Berkow R. The merck manual teşhis / tedavi el kitabı 1. cilt. In: Pekus RM. (Eds). 14. Baskı. İstanbul: Merk Yayıncılık; 1987. p. 787-798.

Bermudez Y, Ahmadi S, Lowell NE, Kruk PA. Vitamin E suppresses telomerase activity in ovarian cancer cells. *Cancer Detection and Prevention* 2007;31(2):119-128.

Bestetti GE, Junker U, Locatelli V, Rossi GL. Continuous subtherapeutic insulin counteracts hypothalamopituitary-gonadal alterations in diabetic rats. *Diabetes* 1987;36(11):1315-1319.

Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of Chemical Research* 2010 16;43(11):1408-1419.

Bhatia S, Shukla R, Madhu SV, Gambhir JK, Prabhu KM. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry* 2003;36(7):557-562.

Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW, Laboratories P. Diabetes antibody standardization program: First assay proficiency evaluation. *Diabetes* 2003;52(5):1128-1136.

Boengler K. Stimulation of cardiac beta-adrenoceptors targets connexin 43. *British Journal of Pharmacology* 2009;158(1):195-197.

Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 2000;54(3):233-236.

Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1790(11):1555-1568.

Briyiba K, Klotz, Sies H. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological Chemistry* 1997;378(11):1259-1265.

Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry* 1996;238(1):1-27.

Burke SD, Dong H, Hazan AD, Croy BA. Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice. *Diabetes* 2007;56(12):2919-2926.

Bülbül A, Soylu SM. Nitrik oksitin kalp damar sistemi üzerine etkileri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 2008;79(2):49-54.

Candan İ. Medikal tedavi. Ankara: Antip A.Ş. Yayınları; 2003. p. 823-846.

Carlson BM. Human embryology and development biology. 3. Baskı. USA: Mosby; 2004. p. 409-420.

Carpenter C, Griggs R, Loscalzo J. Cell essentials of medicine türkçesi. In: Çavuşoğlu H. (Eds). 5. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. p. 583-587.

Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *European Respiratory Journal* 2002;19(5):879-885.

Chabrolle C, JeanPierre1 E, Toscal L, Ramél C, Dupont J. Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2008;6(11):1-14.

Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 2005;146(5):2445–2453.

Chen WG, Zhu XF, Hou JQ, Pu JX, Yan CY. Expressions of eNOS and connexin 43 in the penile tissue of rats with diabetic erectile dysfunction. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2008;14(5):427-430.

Cheng PP, Xia JJ, Wang HL, Chen JB, Wang FY, Zhang Y, Huang X, Zhang QJ, Qi ZQ. Islet transplantation reverses the effects of maternal diabetes on mouse oocytes. *Reproduction* 2011;141(4):417-424.

Ciereszko A, Dabrowski K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction* 1995;52(5):982-988.

Cox NM, Meurer KA, Carlton CA, Tubbs RC, Mannis DP. Effect of diabetes mellitus during the luteal phase of the oestrous cycle on preovulatory follicular function, ovulation and gonadotrophins in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994;101(1):77-86.

Crossmon GC. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion on the principles involved. *The Anatomical Record* 1937;69(1):33-38.

Culling, CFA, Allison, RT, Barr, WT. Cellular pathology technique. 5th Ed. London: Butterworths and Co. Ltd; 1985.

Cushman TT, Kim N, Hoyt R, Traish AM. Estradiol ameliorates diabetes-induced changes in vaginal structure of db/db mouse model. *The journal of Sexual Medicine* 2009a;6(9):2467-2479.

Cushman T, Kim N, Hoyt R, Traish AM. Estradiol restores diabetes-induced reductions in sex steroid receptor expression and distribution in the vagina of db/db mouse model. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2009b;114(3-5):186-194.

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4:92-95.

Çıtıl R, Öztürk Y, Günay O. Kayseri il merkezinde bir sağlık ocağına başvuran diyabetik hastalarda metabolik kontrol durumu ve eşlik eden faktörler. *Erciyes Tıp Dergisi* 2010;32(2):111-122.

Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;305(3):761-770.

Demir N. İç hastalıkları hemşireliği el kitabı. 1. Baskı. İstanbul: Birlik Ofset Ltd. Şti. Vehbi Koç Vakfı Yayınları; 1998. p. 189-197.

Drews U. Renkli embriyoloji atlası. In: Aytekin Y, Gürsoy E. (Eds). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000. p. 334-343.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 2002;82:47-95.

Durand E, Scoazec A, Lafont A, Boddaert J, Al Hajzen A, Addad F, Mirshahi M, Desnos M, Tedgui A, Mallat Z. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation. *Circulation* 2004;109:2503-2506.

Durlej M, Knapczyk-Stwora K, Duda M, Kopera-Sobota I, Hejmej A, Bilinska B, Slomczynska M. Prenatal and neonatal exposure to the antiandrogen flutamide alters connexin 43 gene expression in adult porcine ovary. *Domestic Animal Endocrinology* 2011; 40(1):19–29.

Duzguner V, Kucukgul A, Erdogan S, Celik S, Sahin K. Effect of lycopene administration on plasma glucose, oxidative stress and body weight in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Applied Animal Research* 2008;33(1):17-20.

Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Türkiye Klinikleri Akciğer Arşivi* 2003;4(3):165-174.

Erdost H. Dişi genital sistem. In: Özer A. (Eds). Veteriner özel histoloji. 2. Baskı. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2010. p. 219-244.

Eren U, Sandikci M, Kum S, Eren V. MHC class II+ (HLA-DP-like) cells in the cow reproductive tract: I. Immunolocalization and distribution of MHC class II+ cells in uterus at different phases of the estrous cycle. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 2008;21(1):35-41.

Erener G, Erbaş D, Arıcıoğlu A. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi* 1992;3:243-250.

Ergün L, Şimşek N, Bayraktaroğlu AG, Ergün E, Histoloji atlası uygulama kılavuzu. In: Ergün L. (Eds). 1. Baskı. Ankara: Fenomen Yayıncılık; 2012. p. 100-104.

Eroschenko VP. Di Foe'nin histoloji atlası fonksiyonel ilişkileri ile. Demir R. (Eds). Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. p. 301-327.

Favaro RR, Salgado RM, Raspantini PR, Fortes ZB, Zorn TM. Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. *International Journal of Experimental Pathology* 2010;91(5):426-435.

Fawcett DW. A textbook of histology. 12th Edition. USA: Chapman&Hall; 1993. p. 816-860.

Feng J, Liu Y, Dobrilovic N, Chu LM, Bianchi C, Singh AK, Sellke FW. Altered apoptosis-related signaling after cardioplegic arrest in patients with uncontrolled type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2013;128(26 Suppl 1):S144-151.

Feranil JB, Isobe N, Nakao T. Expression of gap junction protein connexin 43 during follicular atresia in the ovary of swamp buffaloes. *Journal of Reproduction and Development* 2005;51(5):675-681.

Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, Matsui M, Carvalho FA, Tang G, Matsubara LS, Matsubara BB. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007;101(1):16-24.

Ferrini MG, Nolzco G, Vernet D, Gonzalez-Cadavid NF, Berman J. Increased vaginal oxidative stress, apoptosis, and inducible nitric oxide synthase in a diabetic rat model: implications for vaginal fibrosis. *Fertility and Sterility* 2006; 86(4):1152-1163.

Finamor IA, Saccol EM, Gabriel D, Ourique GM, Riffel AP, Konrad SP, Belló-Klein A, Partata W, Baldisserotto B, Llesuy SF, Pavanato MA. Effects of parboiled rice diet on oxidative stress parameters in kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Medicinal Food* 2012;15(7):598-604.

Flamini MA, Díaz AO, Barbeito CG, Portiansky EL. Morphology, morphometry, histochemistry and lectin histochemistry of the vagina of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Biotechnic & Histochemistry* 2012;87(2):81-94.

Ford NA, Elsen AC, Zuniga K, Lindshield BL, Erdman JW Jr. Lycopene and apo-12'-lycopenal reduce cell proliferation and alter cell cycle progression in human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*. 2011;63(2):256-263.

Fornelli F, Leone A, Verdesca I, Minervini F, Zacheo G. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicol In Vitro* 2007;21(2):217-223.

Gaete X, Vivanco M, Eyzaguirre FC, López, P. Rhumie HK, Unanue N, Codner E. Menstrual cycle irregularities and their relationship with HbA1c and insulin dose in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Fertility and Sterility* 2010;94(5):1822-1826.

Gao JX, Li Y, Zhang HY, He XL, Bai AS. Lycopene ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmazie*. 2012;67(3):256-259.

Garris DR, Smith C, Davis D, Diani AR, Gerritsen GC. Morphometric evaluation of the hypothalamic-ovarian axis of the ketonuric, diabetic Chinese hamster: relationship to the reproductive cycle. *Diabetologia*. 1982;23(3):275-279.

Garris DR, Smith C. Diabetes-associated endometrial disruption in the ketonuric, diabetic Chinese hamster. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 1983;16(2):86-96.

Garris DR. Effects of progressive hyperglycemia on ovarian structure and function in the spontaneously diabetic chinese hamster. *The Anatomical Record* 1984;210(3):485-489.

Garris DR, Williams S, Smith-West C, West L. Diabetes-associated endometrial disruption in the Chinese hamster: structural changes in relation to progressive hyperglycemia. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 1984;17(6):293-300.

Garris DR, Williams SK, West L. Morphometric evaluation of diabetes-associated ovarian atrophy in the C57BUKsJ mouse: Relationship to age and ovarian function. *The Anatomical Record* 1985;211(4):434-443.

Garris DR, West RL, Pekala PH. Ultrastructural and metabolic changes associated with reproductive tract atrophy and adiposity in diabetic female mice. *The Anatomical Record* 1986;216(3):359-366.

Garris DR. Effects of diabetes on uterine condition, decidualization, vascularization, and corpus luteum function in the pseudopregnant rat. *Endocrinology*. 1988;122(2):665-672.

Garris DR. Ultrastructural analysis of progressive endometrial hypercytolipidemia induced by obese (ob/ob) and diabetes(db/db) genotype mutations: structural basis of female reproductive tract involution. *Tissue Cell* 2004;36(1):19-28.

Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. USA: W.B. Saunders Company; 1997. p. 382-398.

Gershon E, Plaks V, Dekel N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008;282(1-2):18-25.

Giraldi A, Persson K, Werkström V, Alm P, Wagner G, Andersson KE. Effects of diabetes on neurotransmission in rat vaginal smooth muscle. *International Journal of Impotence Research* 2001;13(2):58-66.

Gittens JE, Mhawi AA, Lidington D, Ouellette Y, Kidder GM. Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2003;284(4):C880-C887.

Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Journal of Molecular Diagnostics* 2004;8(3):141-149.

Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 2010;1(10):888-897.

Granot I, Dekel N. Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of connexin43. *Human Reproduction* 1998;13 Suppl 4:85-97.

Gray CA, Bazer FW, Spencer TE. Effects of neonatal progestin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. *Biology of reproduction* 2001;64(3):797-804.

Groot MJ, den Hartog JMP, Gruys E. Influence of androgens on the genital tract of cyclic heifers. *Veterinary Quarterly* 1989;11(4):198-209.

Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, Joshi S, Halder N, Verma SD. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutrition* 2003;19(9):794-799.

Gupta S, Sharma TK, Kaushik GG, Shekhawat VP. Vitamin E supplementation may ameliorate oxidative stress in type 1 diabetes mellitus patients. *Clinical Laboratory* 2011;57(5-6):379-386.

Güleş Ö. Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008;19(2):73-78.

Güney M. Selenium-vitamin E combination modulates endometrial lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. *Biological Trace Element Research* 2012;149(2):234-240.

Gürsoy E, Toptagel E. *Embriyoloji atlası*. İstanbul: Esnaf Ofset Matbaacılık; 1997. p. 149-164.

Habib SL. Diabetes and renal tubular cell apoptosis. *World Journal of Diabetes* 2013;4(2):27-30.

Hacışevki A. Askorbik asit biyokimyasına bir bakış. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2009;38:233-255.

Haefliger JA, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovascular Research* 2004;62(2):345-356.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. London: Oxford University Press: 1999. p. 218-350.

Hassa O, Aştı RN. Embriyoloji. Ankara: Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti.; 2003. p. 16-24.

Hekimoğlu A. Likopenin antikarsinojenik etki mekanizmaları. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2010;25(1):57-62.

Henriques HN, de Carvalho AC, Soares Filho PJ, Pantaleão JA, Guzmán-Silva MA. Effect of prolonged use of high dose of tibolone on the vagina of ovariectomized rats. International Journal of Experimental Pathology 2011;92(4):266-271.

Hoffman RP, Dye AS, Bauer JA. Ascorbic acid blocks hyperglycemic impairment of endothelial function in adolescents with type 1 diabetes. Pediatric Diabetes 2012;13(8):607-610.

Holzapfel NP, Holzapfel BM, Champ S, Feldthusen J, Clements J, Hutmacher DW. The potential role of lycopene for the prevention and therapy of prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical evidence. International Journal of Molecular Sciences 2013;14:14620-14646.

Hough R, Ulhoq I, Yeo W. İç hastalıkları. In: Süleymanlar İ, Süleymanlar G, Ünal S. (Eds). 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001. p. 311-317.

Howarth FC, Chandler NJ, Kharche S, Tellez JO, Greener ID, Yamanushi TT, Billeter R, Boyett MR, Zhang H, Dobrzynski H. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. Molecular and Cellular Biochemistry 2008;319(1-2):105-114.

Indran M, Rokiah P, Chan SP, Kuppusamy UR. Alteration of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in young Malaysian IDDM patients. Medical Journal of Malaysia 2004;59(2):166-170.

Ingram KH, Hill H, Moellering DR, Hill BG, Lara-Castro C, Newcomer B, Brandon LJ, Ingalls CP, Penumetcha M, Rupp JC, Garvey WT. Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans. The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism 2012;97(7):E1182-1186.

Ivanova II, Lapshina VF, Anishchenko TG. Reactivity of castrated female rats to estrone in alloxan diabetes. *Probl Endokrinol (Mosk)* 1977;23(5):77-80.

İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S. İç hastalıkları 2. cilt. 2. Baskı. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005. p. 2279-2294.

İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2004;2(3):127-136.

Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38(12):1539-1543.

Jain AB, Jain VA. Vitamin E, its beneficial role in diabetes mellitus (DM) and its complications. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2012;6(10):1624-1628.

Jilani T, Iqbal MP. Does vitamin E have a role in treatment and prevention of anemia? *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011;24(2):237-242.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Temel histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B. (Eds). 8. Baskı. İstanbul: Barış Yayınevi; 1998. p. 423-442.

Junqueira LC, Carneiro J, Abrahamsohn PA, Dos Santos MF, Zorn TMT. Temel histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S. (Eds). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006. p. 449-467.

Kamimura W, Doi W, Takemoto K, Ishihara K, Wang DH, Sugiyama H, Oda S, Masuoka N. Effect of vitamin E on alloxan-induced mouse diabetes. *Clinical Biochemistry* 2013;46(9):795-798.

Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and Chemical Toxicology* 2012;50(3-4):719-725.

Karaöz E. Özel histoloji. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi; 2002. p. 216-229.

Karimova OA. Functional state of the ovaries in diabetes mellitus. *Probl Endokrinol* 1983;29(6):3-6.

Karppi J, Laukkanen JA, Sivenius J, Ronkainen K, Kurl S. Serum lycopene decreases the risk of stroke in men: a population-based follow-up study. *Neurology*. 2012;79(15):1540-1547.

Kaufmann PA, Gneccchi-Ruscone T, Di Terlizzi M, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG. Coronary heart disease in smokers vitamin C restores coronary microcirculatory function. *Circulation* 2000;102:1233-1238.

Kavas G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989;9(1):1-8.

Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürek M. İnsan embriyoloji. 7. Baskı. İstanbul: Alfa Basım Yayım Dağıtım; 1992. p. 207-221.

Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radical Research* 2011;45(8):925-940.

Kempf K, Herder C, Erlund I, Kolb H, Martin S, Carstensen M, Koenig W, Sundvall J, Bidel S, Kuha S, Jaakko T. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *The American journal of clinical nutrition* 2010; 91(4):950-957.

Khan-Dawood FS. Oxytocin in intercellular communication in the corpus luteum. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1997;15(4):395-407.

Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology* 1998;138(5):482-491.

Kim SM, Kwak DH, Kim SM, Jung JU, Lee DH, Lee S, Jung KY, Do SII, Choo YK. Differential expression of gangliosides in the ovary and uterus of streptozotocin-induced and db/db diabetic mice. *Archives of Pharmacal Research* 2006a;29(8):666-676.

Kim NN, Stankovic M, Cushman TT, Goldstein I, Munarriz R, Traish AM. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers. *BMC Physiology* 2006b;6(4):10.1186/1472-6793-6-4.

Kim YR, Lee JS, Lee KR, Kim YE, Baek NI, Hong EK. Effects of mulberry ethanol extracts on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in pancreatic β -cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2013;33(1):128-134.

Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W, Kinalska I. Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetologica* 2000;37(4):179-183.

Kirkland JL, Barrett GN, Stancel GM. Decreased cell division of the uterine luminal epithelium of diabetic rats in response to 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 1981;109(1):316-318.

Knight JA. Free radicals, antioxidants, aging and disease. USA: AACC Press; 1999. p. 1-88.

Korkmaz GG, Uzun H, Cakatay U, Aydin S. Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clinical & Investigative Medicine* 2012;35(6):E370-377.

Koyama H, Nojiri H, Kawakami S, Sunagawa T, Shirasawa T, Shimizu T. Antioxidants improve the phenotypes of dilated cardiomyopathy and muscle fatigue in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Molecules* 2013;18(29):1383-1393.

Krause WJ. Essentials of human histology. 2nd Ed. USA: Little, Brown and Company; 1996. p. 353-369.

Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, D'Herde K. Gap junctional communication and connexin-43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2004;52(9):1199-207.

Kuhad A, Chopra K. Lycopene ameliorates thermal hyperalgesia and cold allodynia in STZ-induced diabetic rat. *Indian Journal of Experimental Biology* 2008;46(2):108-111.

Kuhad A, Sethi R, Chopra K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sciences* 2008a;83(3-4):128-134.

Kuhad A, Sharma S, Chopra K. Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *European Journal of Pain* 2008b;12(5):624-632.

Kumar JS, Menon VP Peroxidative changes in experimental diabetes mellitus. *The Indian Journal of Medical Research* 1992;96:176-181.

Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, Shankar V. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus patients with and without nephropathy. *North American Journal of Medical Sciences* 2013;5(3):213-219.

Kuroki T, Inoguchi T, Umeda F, Ueda F, Nawata H. High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes* 1998;47(6):931–936.

Laird DW. Closing the gap on autosomal dominant connexin-26 and connexin-43 mutants linked to human disease. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283:2997-3001.

Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000;384(2):205-215.

Larsen JF. Electron microscopy of the uterine epithelium in the rabbit. *The Journal of Cell Biology* 1962;14:49-64.

Lasnitzki I. The effect of radiation on the normal and oestrone treated mouse vagina grown in vitro. *The British Journal of Radiology* 1961;34:356-361.

Latchoumycandane C, Mathur PP. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin toxicity in rat testis. *Journal of Applied Toxicology* 2002;22(5):345-351.

Lee HS, Li Z, Kim SO, Ahn K, Kim NN, Park K. Effect of hyperglycemia on expression of aquaporins in the rat vagina. *Urology* 2012;80(3):737.e7–737.e12.

Li AF, Sato T, Haimovici R, Okamoto T, Roy S. High glucose alters connexin 43 expression and gapjunction intercellular communication activity in retinalpericytes. *Invest Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003;44(12):5376-5382.

Li ZZ, Lu XZ, Ma CC, Chen L. Serum lycopene levels in patients with diabetic retinopathy. *European Journal of Ophthalmology* 2010;20(4):719-723.

Liebhart M, Szamborski J. Ultrastructure of the capillaries of the reproductive system in female rabbits with alloxan diabetes. *Polish Medical Sciences and History Bulletin* 1974;15(2):133-137.

Likidlilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *Journal of The Medical Association of Thailand* 2010;93(6):682-693.

Lin H, Ogawa K, Imanaga I, Tribulova N. Alterations of connexin 43 in the diabetic rat heart. *Advances in Cardiology* 2006;42:243-254.

Lin S, Lin K, Li W, Zhou X, Huang T. Maternal diabetes increases apoptosis in mice oocytes, not 2-cell embryos. *Endocrine* 2010;37(3):460-466.

Liu C, Wang R, Zhang B, Hu C, Zhang H. Protective effects of lycopene on oxidative stress, proliferation and autophagy in iron supplementation rats. *Biological Research* 2013;46(2):189-200.

Livny O, Kaplan I, Reifen R, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *Journal of Nutrition* 2002;132(12):3754-3759.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal* 1987;1(6):441-445.

MacMillan-Crow LA, Crow JP. Does more MnSOD mean more hydrogen peroxide? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2011;11(2):178-180.

Madazlı R, Tuten A, Calay Z, Uzun H, Uludag S, Ocak V. The incidence of placental abnormalities, maternal and cord plasma malondialdehyde and vascular endothelial growth factor levels in women with gestational diabetes mellitus and nondiabetic controls. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2008;65:227-232.

Malcangio M, Tomlinson DR. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain* 1998;76(1-2):151-157.

Mammadov R. Vitaminler. 1. Baskı. Ankara: Nobel Yayınlar; 2002. p. 32-99.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrus cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 2002;62(4A):609-614.

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biology of Reproduction* 2005;72(6):1344-1351.

Matsuuchi L, Naus CC. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1828(1):94-108.

Mayor P, Jori F, Lo'pez-Be'jar M. Anatomicohistological characteristics of the tubular genital organs of the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from north-eastern amazon. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 2004;33(2):65-74.

McDowell LR. Vitaminler in animal and human nutrition. 2nd (Eds). USA: Iowa State University Press; 2000. p. 155-634.

McMurtrie EM, Ginsberg GG, Frederick GT, Kirkland JL, Stancel GM, Gardner RM. Effect of a diabetic state on myometrial ultrastructure and isolated uterine contractions in the rat. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1985;180(3):497-504.

Meens MJ, Pfenniger A, Kwak BR, Delmar M. Regulation of cardiovascular connexins by mechanical forces and junctions. *Cardiovascular Research* 2013;99(2):304-314.

Memisogullari R, Taysı S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Function* 2003;21(3):291-296.

Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005;3:30-39.

Meurer KA, Cox NM, Matamoros IA, Tubbs RC. Decreased follicular steroids and insulin-like growth factor-I and increased atresia in diabetic gilts during follicular growth stimulated with PMSG. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991;91(1):187-196.

Mikaelian NP, Gurina AE, Terent'ev AA. Dysfunction of membrane-receptor system of blood cells and kidney tissue in experimental diabetes mellitus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2013;154(5):610-613.

Mikirova N, Casciari J, Rogers A, Taylor P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *Journal of Translational Medicine* 2012;10:1-10.

Moore KL, Persaud TVN. İnsan embriyolojisi klinik yönleri ile. In: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. (Eds). 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. p. 323-335.

Morakinyo AO, Adekunbi DA, Dada KA, Adegoke OA. Testosterone promotes glucose intolerance, lipid disorder and oxidative stress in type 1 diabetic rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 2013;17:1-8.

Mordente A, Guantario B, Meucci E, Silvestrini A, Lombardi E, Martorana GE, Giardina B, Böhm V. Lycopene and cardiovascular diseases: an update. *Current Medicinal Chemistry* 2011;18(8):1146-1163.

Morel S, Kwak BR. Vascular connexins in restenosis after balloon injury. *Methods in Molecular Biology* 2013;1037:381-398.

Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca (2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 2012;32(3):134-141.

Neyestani TR, Shariatzadeh N, Gharavi A, Kalayi A, Khalaji N. Physiological dose of lycopene suppressed oxidative stress and enhanced serum levels of immunoglobulin M in patients with Type 2 diabetes mellitus: a possible role in the prevention of long-term complications. *Journal of Endocrinological Investigation* 2007;30(10):833-838.

Nielsen MS, Nygaard Axelsen L, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Comprehensive Physiology* 2012;2(3):1981-2035.

Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 2007;134:209-221.

Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009;61(4):319-326.

Noci IVO, Borri P, Chieffi O, Scarselli G, Biagiotti R, Moncini D, Paglierani M, Taddei G. I. Aging of the human endometrium: a basic morphological and immunohistochemical study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1995;63(2):181-185.

Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of Reproduction and Fertility* 1998;114:341-346.

Ojha S, Goyal S, Sharma C, Arora S, Kumari S, Arya DS. Cardioprotective effect of lycopene against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Human & Experimental Toxicology* 2013;32(5):492-503.

Okruhlicova L, Tribulova N, Misejkova M, Kucka M, Stetka R, Slezak J, Manoach M. Gap junction remodelling is involved in the susceptibility of diabetic rats to hypokalemia-induced ventricular fibrillation. *Acta histochemica* 2002;104(4):387-391.

Olfer'ev AM, Il'ina MV, Berzak NV, Stetsenko AV, Olfer'ev MA, Chudakova IA, Kapitanov AB, Shamarin VM. Effect of lycopene on blood lipoproteids in women with type 2 diabetes mellitus in postmenopause. *Vopr Pitan* 2004;73(1):19-23.

Owu DU, Obembe AO, Nwokocha CR, Edoho IE, Osim EE. Gastric ulceration in diabetes mellitus: Protective role of vitamin C. *ISRN Gastroenterology* 2012;2012:1-7.

Ozkul A, Ayhan M, Yenisey C, Akyol A, Guney E, Ergin FA. The role of oxidative stress and endothelial injury in diabetic neuropathy and neuropathic pain. *Neuroendocrinology Letters* 2010;31(2):261-264.

Ozmutlu S, Dede S, Ceylan E. The effect of lycopene treatment on ACE activity in rats with experimental diabetes. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2012;13(3):328-333.

Öbek A. İç hastalıkları. İstanbul: Güneş Kitabevi; 1990. p.46-101.

Ötleş S, Atlı Y. Karotenoidlerin insan sağlığı açısından önemi. *Mühendis Bilimleri Dergisi* 1997;3:249-254.

Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;9(2):143-148.

Paker Ş. Histoloji. 2. Baskı. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1993. p. 223-255.

Palozza P, Catalano A, Simone R, Cittadini A. Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochimica Polonica* 2012;59:21-25.

Park K, Ryu SB, Park YI, Ahn K, Lee SN, Nam JH. Diabetes mellitus induces vaginal tissue fibrosis by TGF- β 1 expression in the rat model. *Journal of Sex & Marital Therapy* 2001;27(5):577–587.

Park K, Ahn K, Chang JS, Lee SE, Ryu SB, Park YIL. Diabetes induced alteration of clitoral hemodynamics and structure in the rabbit. *The Journal of Urology* 2002;168(3):1269-1272.

Park S, Han SS, Park CH, Hahm ER, Lee SJ, Park HK, Lee SH, Kim WS, Jung CW, Park K, Riordan HD, Kimler BF, Kim K, Lee JH. L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36(11):2180-2195.

Patel BM, Kakadiya J, Goyal RK, Mehta AA. Effect of spironolactone on cardiovascular complications associated with type-2 diabetes in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2013;121(08):441-447.

Pattison DI, Davies MJ. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chemical Research in Toxicology* 2001;14(10): 1453-1464.

Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in mouse ovary. *Journal of Reproduction and Infertility* 1968;17:555-557.

Petorak İ. Medikal embriyoloji. 2. Baskı. İstanbul: Beta Basım Yayın Dağıtım; 1986. p. 220-242.

Pfenniger A, Chanson M, Kwak BR. Connexins in atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1828(1):157-166.

Pickup JC, Williams G. Textbook of diabetes volume 1. 2nd Ed. Wiley-Blackwell; 2002.

Pluta K, Irwin JA, Dolphin C, Richardson L, Fitzpatrick E, Gallagher ME, Reid CJ, Crowe MA, Roche JF, Lonergan P, Carrington SD, Evans ACO. Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periestrus period in cattle. *Journal of Animal Science* 2011;89(12):4032-4042.

Poladia DP, Schanbacher B, Wallace LJ, Bauer JA. Innervation and connexin isoform expression during diabetes-related bladder dysfunction: early structural vs. neuronal remodelling. *Acta Diabetologica* 2005;42(3):147-152.

Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 1999;6(2):99-104.

Powers RW, Chambers C, Larsen WJ. Diabetes-mediated decreases in ovarian superoxide dismutase activity are related to blood-follicle barrier and ovulation defects. *Endocrinology*. 1996;137(7):3101-3110.

Ramel F, Mialoundama AS, Havaux M. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 2013;64(3):799-805.

Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. *Molecular Endocrinology* 2008;22(12):2643–2654.

Rehák P, Mihálik J, Veselá J, Cikos S, Baran V, Koppel J. Effects of impaired maternal insulin secretion on preimplantation embryo development in ICR mice. *Physiological Research* 1996;45(6):453-458.

Riccioni G. Carotenoids and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports* 2009;11(6):343-349.

Rømer J, Hasselager E, Nørby PL, Steiniche T, Clausen JT, Kragballe K. Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine A or calcipotriol. *The Journal of Investigative Dermatology* 2003;121(6):1306-1311.

Ross MH, Romrell LJ, GI Kaye. *Histology a text and atlas*. 3rd Edition. USA: Williams&Wilkins; 1995. p. 678-709.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology a text and atlas with cell and molecular biology*. USA: Lippincott Williams&Wilkins; 2003. p. 727-759.

Rössig L, Hoffmann J, Hugel B, Mallat Z, Haase A, Freyssinet JM, Tedgui A, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation* 2001;30;104:2182-2187.

Runge MS, Greganti MA. Netter iç hastalıkları. In: Ünal S, Demir M. (Eds). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2009. p. 185-192.

Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiology of Disease* 1999;6(5):347-363.

Saad A, Ahmad W, Haque AMTE, Al-Jassabi S. The role of lycopene from zizyphus spina-christi in the prevention of streptozotocin-induced diabetes mellitus in Balb/C mice. *Middle-East Journal of Scientific Research* 2013;16(7):952-956.

Sadler TW. Langman medikal embriyoloji. In: Başaklar AC. (Eds). 9. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005. p. 328-345.

Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological Reviews* 2003;83(4):1359-1400.

Sağsöz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Molecular Human Reproduction* 2002;(17(11):2972-2976.

Sahin K, Sahin N, Kucuk O. Lycopene and chemotherapy toxicity. *Nutrition and Cancer* 2010;62(7):988-995.

Salameh A, Blanke K, Daehnert I. Role of connexins in human congenital heart disease: the chicken and egg problem. *Frontiers in pharmacology* 2013;4:70.

Santos TC, Tonarelli C, Teixeira FA, Oliveira MF, Maria D, Reginato P, Kfoury JR Jr, Oliveira CA, Lourenço DA, Miglino MA. Histomorphometrical and proliferative aspects of placenta and uterus of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Histology and Histopathology* 2012;27(6):793-806.

Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Failure Reviews* 2007;12(3-4):261-266.

Scibior D, Cieczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2006;60:170-180.

Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells* 2004;17(1):132-139.

Shima H, Naeem E, Hassan M, Hossein N. Aloe vera gel protects ovarian structure in diabetic rat. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 2011;3(3):197-203.

Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997;385;(6616):525-529.

Singh K, Bal BS, Chopra S, Singh S, Malhotra N. Ameliorative effect of lycopene on lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in diabetic patients. *Journal of Diabetes & Metabolism* 2012;3(6):1-5.

Škrha J, Hodinár A, Kvasnička J, Hilgertová J. Relationship of oxidative stress and fibrinolysis in diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 1996;13(9):800-805.

Snajderová M, Martínek J, Horejsí J, Nováková D, Lebl J, Kolousková S. Premenarchal and postmenarchal girls with insulin-dependent diabetes mellitus: Ovarian and other organ-specific autoantibodies, menstrual cycle. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* 1999;12(4):209-214.

Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, Cooke PS. Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1120:131-43.

Sternberg SS. *Histology for pathologists*. 2nd Edition. USA: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 851-960.

Strotmeyer ES, Steenkiste AR, Foley TP, Berga SL, Dorman JS. Menstrual cycle differences between women with type 1 diabetes and women without diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(4):1016–1021.

Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55(1):225-233.

Süleyman Demir S, Özkurt S, Köseoğlu M, Enli Y, Aslan D, Gümüşsu N. Sigara içenlerde plazma lipid peroksidasyonu. *Solunum* 2001;3(2):57-59.

Talbot J, Verrecchia F. Gap junctions and bone remodeling. *Biologie Aujourd'hui* 2012;206(2):125-134.

Taniguchi Y, Hasegawa Y, Igarashi M. Mechanism of inhibition of hypothalamic pituitary-ovarian function in streptozotocin-diabetic mature female rats. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1984;36(4):557-563.

Tanyolaç A. Özel histoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum Basım Yayın; 1999. p.144-157.

Tatewaki R, Otani H, Tanaka O, Kitada J. A morphological study on the reproductive organs as a possible cause of developmental abnormalities in diabetic NOD mice. *Histology and Histopathology* 1989;4(3):343-358.

Tesone M, Ladenheim RG, Oliveira-Filho RM, Chiauzzi VA, Foglia VG, Charreau EH. Ovarian dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1983;174(1):123-130.

Theis M, Giaume C. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Research* 2012;1487:88-98.

Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, Roy S. Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2013;54(10):6518-6525.

Tok EC, Ertunc D, Evruke C, Dilek S. The androgenic profile of women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Reproductive Medicine* 2004;49(9):746-752.

Trejo-Solís C, Pedraza-Chaverri J, Torres-Ramos M, Jiménez-Farfán D, Cruz Salgado A, Serrano-García N, Osorio-Rico L, Sotelo J. Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;2013:705121.

Turgut B, Demir T, Ülkü Celikler Ü. Oftalmolojide apopitoz. *Firat Tıp Dergisi* 2006;11(1):6-11.

Turhan F, Erdoğan D, Take G, Bardakçı Y. Electron microscopic changes in the rat uterus during the menstrual cycle. *Gazi Medical Journal* 2008;19(3):102-111.

Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Çeribaşı AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007;67(4):778-785.

Türkoğlu S, Muz MH, Özercan R, Gürsu F, Kırkıl G. Effects of lycopene on the model of oleic acid-induced acute lung injury. *Tüberk Toraks* 2012;60(2):101-107.

Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997;4(4):453-461.

Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *The Journal of Experimental Biology* 2002;205(Pt6):711-8.

Valdes CT, Elkind-Hirsch KE, Rogers DG. Diabetes-induced alterations of reproductive and adrenal function in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1990;51(4):406-412.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39(1):44–84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006;160(1):1-40.

Verma RJ, Nair A. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian Journal of Andrology* 2001;3:217-221.

Veselá J, Cíkos S, Hlinka D, Rehák P, Baran V, Koppel J. Effects of impaired insulin secretion on the fertilization of mouse oocytes. *Human Reproduction* 1995;10(12):3233-3236.

Vinciguerra M, Santini MP, Martinez C, Pazienza V, Claycomb WC, Giuliani A, Rosenthal N. mIGF-1/JNK1/SirT1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart. *Aging Cell* 2012;11:139–149.

Wang C, Umesaki N, Nakamura H, Tanaka T, Nakatani K, Sakaguchi I, Ogita S, Kaneda K. Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell and Tissue Research* 2000;300(2):285-293.

Wang C, Tanaka T, Nakamura H, Umesaki N, Hirai K, Ishiko O, Ogita S, Kaneda K. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. *Microscopy Research and Technique* 2003;60(4):420-429.

Wang Q, Frolova AI, Purcell S, Adastra K, Schoeller E, Chi MM, Schedl T, Moley KH. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in cumulus cells of type I diabetic mice. *Plos One* 2010;5(12):e15901.

Wei CJ, Xu X, Lo CW. Connexin and cell signaling in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2004; 20: 811-838.

Wick R, Kress A. Ultrastructural changes in the uterine luminal and glandular epithelium during the oestrous cycle of the marsupial *monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):111-131.

Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 2000;29(5):403-409.

Witte TS, Melkus E, Walterc I, Senged B, Schwabd S, Aurichb C, Heuwieser W. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. *Theriogenology* 2012;78:1199-1208.

Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1998;9(1-2):89-95.

Yasavul Ü. Hacettepe iç hastalıkları kitabı. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2004. p. 503-509.

Yasui K, Kada K, Hojo M, Lee JK, Kamiya K, Toyama J, Opthof T, Kodama I. Cell-to-cell interaction prevents cell death in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* 2000;48(1):68-76.

Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflammation Research* 2006;55(9):359-363.

Yatkın E. Sentetik östrojen ve fitoöstrojenlerin dişi ratlarda genital organlar üzerine etkisi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2005.

Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan GG. Apoptoz: Düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptozu saptama yöntemleri. *Türkiye Klinikleri* 2009;29(6):1677-1686.

Young B, Heat JW. Wheatter's functional histology a text and colour atlas. 4th Ed. Sydney: Churchill Livingstone International Edition; 2000. p. 340-359.

Yue H, Xin-nan S, Yan-ni L, Guo-ying Y. The preventive effect of lycopene on hyperglycemia in alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. *Acta Nutrimenta Sinica* 2006;28(3):244-246.

Yue R, Hu H, Yiu KH, Luo T, Zhou Z, Xu L, Zhang S, Li K, Yu Z. Lycopene protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction in primary neonatal mouse cardiomyocytes. *Plos One*. 2012;7:e50778.

Zakaria R, Rajikin MH, Yaacob NS, Nor NM. Diabetes alters the mRNA expression of insulin-like growth factors and their receptors in the mouse fallopian tube and uterus during the preimplantation stages. *Reproductive Biology* 2007;7(1):41–53.

Zamani M, Hassanshahi J, Soleimani M, F Zamani F. Neuroprotective effect of olive oil in the hippocampus CA1 neurons following ischemia: Reperfusion in mice. *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 2013;4(2):164–170.

Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Research* 1992;52:5707-5712.

Zhang W, Peeyush Khanna P, Chan LL, Campbell G, Ansari NH. Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochemical and Molecular Medicine* 1997;61(1):58-62.

Zhang S. *An atlas of histology*. 1st Ed. New York: Springer; 1999. p. 297-325.

Zhang JH, Yamada AT, Croy BA. DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. *Placenta* 2009;30(11):968-973.

Zhang D, Du G, Chen J. Fermentation production of microbial catalase and its application in textile industry. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2010;26(11):1473-1481.

Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian Journal of Andrology* 2006;8(5):584-588.

Zhou C, Han W, Zhang P, Cai M, Wei D, Zhang C. Lycopene from tomatoes partially alleviates the bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis in rats. *Nutrition Research* 2008;28(2):122-130.

Zhu J, Wang CG, Xu YG. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. *Pharmaceutical Biology* 2011;49(11):1144-1149.

Zık B, Akkoç CGÖ, Tütüncü Ş. Sıçan ovaryumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010;57:223-228.

Ziegler AG, Ziegler R, Vardi P, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody-positive relatives of individuals with type I diabetes. *Diabetes* 1989;38(10):1320-1325.

ÖZGEÇMİŞ

Çanakkale/Biga/Bakacaklı Çiftliği köyünde 1981 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Biga’da, lise eğitimini ise Çan/Çanakkale’de Sağlık Meslek Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Muğla Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Memurluğu bölümünde 1999-2005 yılları arasında gerçekleştirdi. Siirt/Kurtalan/Kayabağlar Sağlık Ocağına 2002 yılında sağlık memuru olarak atandı. Uzun bir süre Muğla’da farklı sağlık kuruluşlarında çalıştı. Yüksek lisans eğitimini 2006-2008 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirdi. Doktora eğitimine 2009 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında başladı. Halen Aydın Kadın-Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Çocuk Acil Servisinde sağlık memuru olarak görev yapmaktadır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında her türlü bilgi birikimiyle bana yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI'ya, araştırma sırasında dokulardaki histopatolojik farklılıkların belirlenmesindeki yardımlarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Recai TUNCA'ya, ELISA tekniğinin uygulanması sırasındaki yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Funda KIRAL ve Araş. Gör. Gamze TOSUN'a, verilerin istatistiksel analizinde yardımlarından dolayı Zootečni Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüsnü Erbay BARDAKÇIOĞLU ile Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL'a ve bu günlere ulaşmamda her zaman manevi desteklerini hissettiğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa YILDIZ