



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**DİYABETİK RAT MODELİNDE PRP'NİN OVER VE
ENDOMETRİUM ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Nigar ÇETİNKAYA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Burcu ARTUNÇ ÜLKÜMEN

Manisa, 2023



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**DİYABETİK RAT MODELİNDE PRP'NİN OVER VE
ENDOMETRİUM ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Nigar ÇETİNKAYA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Burcu ARTUNÇ ÜLKÜMEN

Manisa, 2023

ÖNSÖZ

Asistanlığım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan, sabır ve hoşgörüyü hiç elden bırakmayan, her anımda yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Burcu ARTUNÇ ÜLKÜMEN'e;

Asistanlık süresi boyunca tecrübe, beceri ve bilgilerini bizlere aktaran sayın hocalarım Prof. Dr. Semra Oruç, Prof. Dr. Tefvik Güvenal, Prof. Dr. Naci Kemal KUŞÇU, Prof. Dr. Hasan Tayfun Özçakır, Prof. Dr. Aslı Göker, Doç. Dr. Yıldız Uyar, Doç. Dr. Pınar Solmaz Hasdemir'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Elgin Türköz Uluer'e ve Arş. Gör. Dr. Hilal Kabadayı'ya;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Arş. Gör. Dr. Aygöl Aliyeva ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında görevli tüm doktor arkadaşlarıma;

Rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tüm hocalarıma, uzman ve asistan meslektaşlarıma;

Uzmanlık eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm hemşire arkadaşlarıma, poliklinik ve servisimizdeki tüm tıbbi sekreter ve yardımcı sağlık personellerimize içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini daima yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde sonsuz emek, özveri ve fedakârlıkların sahibi canım annem, babam ve biricik kardeşime tüm içtenliğimle ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum.

Sonsuz teşekkür ederim, iyi ki varsınız...

Dr. Nigar ÇETİNKAYA

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: TEMD'E GÖRE DİABETES MELLİTUS VE GLUKOZ METABOLİZMASININ DİĞER BOZUKLUKLARININ TANI KRİTERLERİ	7
TABLO 2: ERİŞKİN OLGULAR İÇİN DİYABET TEDAVİSİ GLİSEMİK KONTROL HEDEFLERİ	11
TABLO 3: ORAL ANTİDİYABETİK AJANLAR	12
TABLO 4: DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN İNSÜLİN FORMLARI	13
TABLO 5: PARAFİN TAKİP PROTOKOLÜ	30
TABLO 6: HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ	32
TABLO 7: İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA PROTOKOLÜ PROSEDÜRÜ	34
TABLO 8: DENEY GRUPLARINA AİT DENEKLERDE KAN GLUKOZ DEĞİŞİMLERİ	37
TABLO 9: DENEY GRUPLARINA AİT DENEKLERDE VÜCUT AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİ	39
TABLO 10: OVARYUMDA AMH DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI	44
TABLO 11: OVARYUMDA PENTRAXİN-3 DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI	46
TABLO 12: OVARYUMDA TGF β DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI	48
TABLO 13: OVARYUMDA VEGF DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI	50
TABLO 14: OVARYUMDA DENEY GRUPLARINDA AMH, PENTRAXİN-3, VEGF VE TGF β DÜZEYLERİNİN DAĞILIMLARI	52
TABLO 15: ENDOMETRİUMDA AMH DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI	53
TABLO 16: ENDOMETRİUMDA PENTRAXİN-3 DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI	55

TABLO 17:ENDOMETRİUMDA TGF β DÜZEYİNİN İZOTONİK, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI.....	57
TABLO 18:ENDOMETRİUMDA VEGF DÜZEYİNİN KONTROL, STZ VE STZ+PRP GRUPLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI.....	59
TABLO 19:ENDOMETRİUMDA DENEY GRUPLARINDA AMH, PENTRAXİN-3, VEGF VE TGF β DÜZEYLERİNİN DAĞILIMLARI	61
TABLO 20:DENEY GRUPLARINDA BİYOKİMYASAL PENTRAXİN-3, VEGF VE TGF β DÜZEYLERİNİN DAĞILIMLARI	65

ŞEKİL DİZİNİ

ŞEKİL 1: OVARYAN FOLLİKÜLLERİN GELİŞİM EVRESİ	17
ŞEKİL 2: ENDOMETRİUMUN HİSTOLOJİK GÖRÜNÜMÜ	19
ŞEKİL 3: PRP HAZIRLANMASI	21
ŞEKİL 4: PRP ELDESİ VE ELISA ANALİZLERİ İÇİN DENEK SIÇANLARDAN KARDİYAK KAN ALIMI.....	29
ŞEKİL 5: DENEY GRUPLARINA AİT DENEKLERDE KAN GLUKOZ DEĞİŞİMLERİ.....	38
ŞEKİL 6: DENEY GRUPLARINA AİT DENEKLERDE VÜCUT AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİ	39
ŞEKİL 7: OVARYUM HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMASI.	40
ŞEKİL 8: UTERUS HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMASI	42
ŞEKİL 9: OVARYUM AMH İMMÜNREAKTİVİTESİ.	45
ŞEKİL 10: OVARYUM PENTRAXİN-3 İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	47
ŞEKİL 11: OVARYUM TGF β İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	49
ŞEKİL 12: OVARYUM VEGF İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	51
ŞEKİL 13: OVARYUMDA AMH, PENTRAXİN 3, VEGF VE TGF β DÜZEYLERİNİN DENEY GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI	52
ŞEKİL 14: ENDOMETRİUM AMH İMMÜNREAKTİVİTESİ.	54
ŞEKİL 15: ENDOMETRİUM PENTRAXİN-3 İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	56
ŞEKİL 16: ENDOMETRİUM TGF β İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	58
ŞEKİL 17: ENDOMETRİUM VEGF İMMÜNREAKTİVİTESİ.....	60
ŞEKİL 18: ENDOMETRİUMDA AMH, PENTRAXİN 3, VEGF VE TGF β DÜZEYLERİNİN DENEY GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI	61
ŞEKİL 19: TÜM GRUPLARA AİT SERUM ÖRNEKLERİNDE VEGF DÜZEYLERİ	62
ŞEKİL 20: TÜM GRUPLARA AİT SERUM ÖRNEKLERİNDE PENTRAXİN 3 DÜZEYLERİ	63
ŞEKİL 21: TÜM GRUPLARA AİT SERUM ÖRNEKLERİNDE TGF β DÜZEYLERİ	64
ŞEKİL 22: BİYOKİMYASAL PENTRAXİN 3, VEGF VE TGF β DÜZEYLERİNİN DENEY GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI	65

KISALTMALAR

- ADA:** Amerikan Diyabet Birliği
AMH: Anti-Müllerian Hormon
APG: Açlık Plazma Glukozu
ART: Asiste Üreme Teknolojileri
BAG: Bozulmuş Açlık Glukozu
BGT: Bozulmuş Glukoz Toleransı
COX-2: Siklooksijenaz-2
DAB: Diaminobenzidine
DM: Diyabetes Mellitus
DPP4: Dipeptidil peptidaz 4
E2: Östradiol
ECM: Hücre Dışı Matriks
FABP2: İntestinal Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 2
FSH: Folikül Stimulan Hormon
GDM: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GLP-1: Glukagon benzeri peptid-1
HIV: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü

H2O2: Hidrojen Peroksit
IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IGF: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü
IVF: İn Vitro Fertilizasyon
kDA: kilodalton
LH: Lüteinize Edici Hormon
MODY: Gençlikte Ortaya Çıkan Erişkin Tip Diyabet
mRNA: messengerRNA
MSC : Mezenkimal Kök Hücreler
OAD: Oral Antidiyabetikler
OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi
PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu
PG: Plazma glukozu
PKOS: Polikistik Over Sendromu
PPAR γ : Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör Gama
PRP : Platelet zengin plazma
POY: Prematür Ovaryan Yetersizlik
PTX3: Pentraxin-3
STZ: Streptozotosin
TEKHARF: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri Çalışması
TEMD: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktör-beta
TNF: Tümör Nekroz Faktörü
TURDEP-II: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II
VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TABLO DİZİNİ	II
ŞEKİL DİZİNİ	IV
KISALTMALAR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VII
I.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 DİYABETES MELLİTUS	3
2.1.1 Tanım ve Tarihçe	3
2.1.2 Epidemiyoloji.....	4
2.1.3 Patofizyoloji.....	5
2.1.4 Komplikasyonlar	6
2.1.5 Tanı kriterleri.....	6
2.1.6 Sınıflandırma	8
2.1.6.1 Tip 1 Diyabetes Mellitus	8
2.1.6.2 Tip 2 Diyabetes Mellitus	9
2.1.6.3 Gestasyonel Diyabetes Mellitus	10
2.1.6.4 Spesifik diyabet tipleri.....	10
2.1.7 Tedavi	11
2.1.8 Deneyssel diyabet oluşturma.....	13
2.1.9 Diyabetin over ve endometrium üzerine etkisi	14

2.2 Over	15
2.3 Endometrium	17
2.4 PRP	19
2.5 AMH	22
2.6 VEGF.....	23
2.7 TGF- β	24
2.8 PENTRAXİN-3.....	25
III. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Çalışma gruplarının oluşturulması	26
3.2. Deneysel Diyabet Modeli Oluşturulması ve Trombositten Zengin Plazma (PRP) eldesi	27
3.3. Histolojik Analiz	29
3.3.1. Doku Takibi.....	29
3.3.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması.....	31
3.4. İmmunohistokimyasal Yöntem.....	32
3.5. Elisa Yöntemi	35
3.6. Histomorfolojik Skarlama.....	36
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	36
IV. BULGULAR	37
4.1. Kontrol ve diyabet gruplarına ait kan glukoz değişimleri.....	37
4.2. Histolojik Bulgular	40
4.2.1 Over:.....	41
4.2.1.1 Over Korteksi.....	41
4.2.1.2 Over Medullası	41
4.2.2 Endometrium	43
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	43

4.3.1. Ovaryumda AMH immünreaktivitesi.....	43
4.3.2. Ovaryumda PENTRAX�N-3 immünreaktivitesi	46
4.3.3. Ovaryumda TGF-� immünreaktivitesi	48
4.3.4. Ovaryumda VEGF immunreaktivitesi	50
4.3.5 Endometriumda AMH immünreaktivitesi	53
4.3.6. Endometriumda PENTRAX�N-3 immünreaktivitesi	55
4.3.7. Endometriumda TGF-� immünreaktivitesi.....	57
4.3.8. Endometriumda VEGF immünreaktivitesi	59
4.4. Biyokimyasal bulgular.....	62
4.4.1 Tüm Gruplara ait serum örneklerinde VEGF, Pentraxin-3 ve TGF� Düzeyleri.....	62
V. TARTIŞMA.....	66
VI. SONUÇ.....	74
VII.ÖZET	76
VIII. ABSTRACT	77
IX. KAYNAKLAR.....	78

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes Mellitus (DM), insülin eksikliği ve/veya dokuların insüline duyarsızlığı sonucu organların uzun süre hiperglisemiye maruz kaldığı bir grup metabolik hastalıktır. Diyabetes Mellitus kronik bir hastalık olup, mikrovasküler hasar ve fibrozis yapıcı etkisi bilinmektedir. Yaşam boyu süren, sürekli izlem ve tedavi gerektiren, hastanın yaşam kalitesini oldukça azaltan Diyabetes Mellitus; morbiditesi, mortalitesi ve topluma ekonomik yükü yüksek kronik bir hastalıktır. Üreme sağlığı açısından değerlendirildiğinde ise, diyabetik farelerde uterus ağırlığının azaldığı, luminal ve glandular epitel içinde lipid biriktiği, endometrium ve myometriumun atrofiye uğradığı ve kas hücre tabakası sayısının azaldığı gösterilmiştir. Diyabetik kadınlarda over ve endometrium fibrozisi erken over yetmezliğine, implantasyon sorunlarına yol açmaktadır.

Over rezervi, overdeki foliküllerin sayısı ve kalitesi olarak tanımlanır. Anti-müllerian hormon (AMH) over granüloza hücrelerinden üretilir. AMH düzeyi primordial hücre rezervinin düzeyini gösterir ve yaşın ilerlemesiyle seviyesi azalır. AMH seviyesi, azalan over fonksiyonunu doğrudan ve erken dönemde gösteren güvenilir bir belirteçtir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) dokularda, mitojenik etkisi sayesinde anjiogenezi uyarabilmekte ve vasküler geçirgenliği arttırabilmektedir. Over fibrozisi ve VEGF üzerine çok az çalışma vardır, ancak over fibrozisinde önemli bir sitokindir ve spesifik mekanizması, tedavideki olası rolü hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Transforme edici büyüme faktör-beta ($TGF-\beta$) dokuların stabilizasyonunda, hücrelerin birbirleriyle olan ilişkilerinde ve hücre farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Hücre çoğalmasını ve büyümesini

inhibe eder. Kronik inflamasyonda skar oluşumunun ve fibrozisin en önemli stimülatörüdür.

Pentraxin-3 (PTX3), uzun pentraksin ailesinin bir üyesi olan bir süper proteindir. PTX3, endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve adipositler gibi hücre bileşenlerinde üretilir. PTX3'ün plazma seviyesi, lokal enflamasyonu yansıtır. PTX3 sentezi inflamasyon bölgelerinde meydana geldiğinden, hastalık aktivitesinde rol oynadığı düşünölmektedir.

Trombositten zengin plazma (PRP) tedavisi, over rezervi çok düşük ve erken over yetersizliği olan kadınlarda fertilitte tedavilerine ek olarak kullanılmaktadır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda yapılan çalışmalar, zayıf over rezervi olması durumunda intraovaryan PRP uygulamasının over fonksiyonuna yardımcı olabileceğini ve hamilelik şansını artırabileceğini düşöndürmektedir.

PRP'nin endometrial disfonksiyonlu ve erken over yetmezliği olan kadınlarda umut verici tedavi yöntemi olabileceği düşünölmektedir. Klinik kullanım için PRP hazırlama yöntemlerinin standardizasyon ihtiyacı açıktır. Ayrıca, klinik çalışmalardan elde edilen veriler sınırlıdır, çoğunluğu randomize çalışma değildir. Bu nedenle; nasıl ve hangi klinik durumlarda uygulanması gerektiğini daha iyi anlamak, PRP etki şekli hakkındaki bilgimizi geliştirmek için hücresel ve moleküler düzeyde iyi tasarlanmış randomize çalışmalar ve temel araştırmalara gerek vardır.

Çalışmamızda antifibrotik özelliği olan PRP'nin diyabetik rat grupları üzerinde over ve endometrium üzerine koruyucu ve tedavi edici rolünün bulunup bulunmadığı ve etkin bulunması halinde hangi parametreler üzerinden takip edilebileceği araştırılacaktır. Böylece hem etiyopatogenezin daha iyi aydınlatılması sağlanacak hem de ölkemiz ve dünya genelinde öncelikli tedavi seçeneklerinin belirlenmesi için literatüre katkıda bulunulacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1 DİYABETES MELLİTUS

2.1.1 Tanım ve Tarihçe

Diyabetes Mellitus, insülin sekresyonu azlığı veya insülinin dokulardaki etkisinde azlık ve bazen de her ikisinin bozukluğundan kaynaklanan, kronik hiperglisemi ile seyreden metabolik bir hastalıktır. Pek çok organı etkileyerek multisistemik bir tutulumu neden olan geniş spektrumlu bir metabolizma hastalığıdır (1).

Klinik olarak ağız kuruluğu, poliüri, noktüri, kilo kaybı, ayaklarda uyuşma ile karşımıza çıkabilmektedir (2).

Diyabet tarihçesi ile ilgili bilgiler ilk çağlara kadar uzanmaktadır. İlk olarak milattan önce 1500 yıllarında, Hint ve Mısır uygarlığı papirüslerinde çok su içen ve idrara çıkan insanlardan bahsedilerek, diyabetten söz edilmektedir (3). Hindular böcek ve karıncaların idrarın olduğu yerde biriktiğini görmüşler ve idrarın tatlı olduğunu düşünmüşlerdir. Milattan sonra birinci yüzyılda Anadolu'da yaşamış olan Arateus tarafından idrar fazlalığı nedeni ile hastalığa 'diabetes' adı verilmiştir (4). Fransız bilim adamı Claude Bernard kandaki glukozun karaciğerdeki glukoz depolarından kana verildiğini bulunca, karaciğer diyabet patogeneğinde merkez organ haline gelmiştir. Diyabetes Mellitus'ta asıl organın pankreas olduğunun keşfi, 1889 yılında Oscar Minkowski ve Josef von Mering tarafından pankreatektomi uygulanan köpeğin diyabetik olduğunun belirlenmesi ile gerçekleşmiştir (5). 1921 yılında Kanada Toronto Üniversitesi'nden Fredirick G. Banting ve arkadaşları, ortak çalışmaları sonucu insülini keşfetmişlerdir. İlk insan deneyinde Collip

tarafından elde edilen insülin daha da saflaştırılarak 10 Ocak 1922'de diyabetik bir hastaya verilmiş ve DM hastalığı tedavi edilmiştir (5). Paris'te bir araştırmacı bazı diyabetik bireylerin protein kaybettiğini bazılarının ise fazla protein kaybetmediğini gözlemlemiştir ve Tip 1 DM ile Tip 2 DM ayırımından bahsetmiştir. Labbe, diyet programının da ilaçlar kadar önemli olduğunu vurgulamıştır (5).

2.1.2 Epidemiyoloji

Diyabetes Mellitus, prevalansı ve komplikasyonları göz önüne alındığında önemi gittikçe artan bir sağlık problemidir. Maddi anlamda da ülkelere büyük bir yük getirmektedir. Dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (13).

Diyabet dağılımı ülkeler arasında değişimler göstermektedir. Az gelişmiş ülkelerde diyabetin sıklığının daha az olduğu bildirilmektedir. DM'nin görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır.

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre 2021 yılında 537 milyon yetişkin diyabet ile yaşamaktadır. Bu da her 10 kişiden birinin diyabet olduğu anlamını taşımaktadır. Bu sayının 2030'da 643 milyona ve 2045'te 783 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Diyabet tanısı alan her 4 yetişkinden 3'ü düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. 2021 yılında gerçekleşen 6,7 milyon ölümden diyabet sorumlu tutulmaktadır. Bu sayı da her 5 saniyede bir ölümü göstermektedir. Diyabet, son 15 yılda %316'lık bir artışla en az 966 milyar dolarlık sağlık harcamasına neden olmuştur (14).

Ülkemizde ise Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması (TURDEP-II)'na göre son 12 yılda diyabet sıklığı %90 artarken, obezite oranı %44 artmıştır. Diyabet sıklığı %13,7 olarak hesaplanırken bu oranın öngörülenin çok üstünde olduğu belirtilmiştir (15).

Ülkemizde gerçekleştirilen Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri Çalışması (TEKHARF)'nın 2017 yılında yayınlanan verilerine göre diyabet prevalansı 1990-2011 yılları arasında yılda %6.3'e denk gelen bir oranla artarak 1.1 milyondan yaklaşık 4 milyona çıkmıştır. TEK HARF

alışmasında lkemizdeki diyabetli erişkin sayısının dünyadaki yıllık artışa göre daha fazla olduğu belirtilmektedir. Diyabet insidansının artmasında da diyabete neden olan etmenlerin artması suçlanmaktadır (16).

2.1.3 Patofizyoloji

Diyabetes Mellitus patofizyolojisinde hücre disfonksiyonu, insülin direnci ve β hücrelerinin yetersizliği bildirilmiştir. İleri yaş, artmış kalori alımı, azalan enerji harcaması, yağdan zengin besinlerin tüketimi, obezite gelişimi gibi çevresel faktörler de patogeneze önemli yer tutar (6).

İnsülin karaciğer, kas ve yağ dokusu üzerinde etkili bir hormondur. İnsülin karaciğerde glikolizi hızlandırır, glukoneogenezi ve hepatik glukoz üretimini inhibe eder. Glukozun yağ ve kas dokusuna alımından ve burada enerji kaynağı olarak depolanmasından sorumludur. İnsülin direnci ile karaciğer, lipid, kas metabolizmasına ve diğer etkilere karşı direnç gelişir. Yağ ve kas dokusunun glukoz alımında azalma yani periferik insülin direnci ile kan glukoz seviyesi artar. Kan glukozunun belirli bir aralıktaki tutulmasının sağlanması için geri bildirim mekanizması ile β hücresinden insülin salınır (7). İnsülin direnci bu döngüyü bozar, β hücreleri normal glukoz dengesini korumak için insülin çıkışını arttırır. Bunun sonucunda β hücreleri görevini yerine getirmekte zorlanır ve ortaya insülin salınım eksikliği çıkar, plazma glukozu artar (7).

Hücre disfonksiyonunda genetik faktörler de yer almaktadır. Son gelişmelerle diyabet oluşumunda elliden fazla gen tanımlanmıştır. Bunlardan ilki peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama (PPAR γ)'dır (8).

Glukagonun α -hücrelerden düzensiz salınımı da hiperglisemi patolojisinde suçlanmaktadır. Bu durumun α -hücresindeki birincil bir değişiklikten mi yoksa β hücre fonksiyonundaki bozukluğa mı bağlı olduğu aydınlatılamamıştır (9).

2.1.4 Komplikasyonlar

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların gelişiminin önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan araştırma konuları arasında ilk sıralardaki yerini korumaktadır.

Kontrol edilemeyen ve sürekli hiperglisemi durumu uzun vadede çeşitli organlarda yetersizlik ile sonuçlanan kronik komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır. Kronik komplikasyonlar, mikrovasküler komplikasyonlar ve makrovasküler komplikasyonlar şeklinde incelenmektedir (10). Retinopati, nefropati, nöropati, myopati gibi mikrovasküler komplikasyonlar ile miyokard infarktüsü, inme, periferik arter hastalığı gibi makrovasküler komplikasyonlar gelişebilir (3). DM'nin diğer komplikasyonları arasında demans, depresyon ve cinsel işlev bozukluğu yer alır (11).

DM'nin dokularda meydana getirdiğı mikrovasküler ve makrovasküler hasarların sebepleri arasında proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonu ve glikolize proteinlerin biyolojik fonksiyonlarını yerine getirememeleri suçlanmaktadır (12).

2.1.5 Tanı kriterleri

Diyabet tanısı koyabilmek için gerekli kriterler, klinikte sıklıkla başvuru alan Amerikan Diyabet Topluluğu (ADA) ve Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) kılavuzlarında açıkça belirtilmiştir.

- Açlık veya tokluk döneminde rastgele alınan plazma glukoz değerinin 200 mg/dl veya üzerinde olması ve buna diyabet semptomlarının eşlik etmesi,
- En az 8 saatlik açlığı takiben ölçülen kan şekerinin 126 mg/dl veya üzerinde olması,
- 75 gram glukoz ile yapılan oral glukoz tolerans testi (OGTT)'nin 2. saatinde ölçülen plazma glukozunun 200 mg/dl veya üzerinde olması,
- HbA1c değerinin %6.5'tan büyük veya eşit olması

Kriterlerinden en az bir tanesinin olması tanı koydurucudur (17).

Hipergliseminin aşikar semptomları olmadığında tanı için tarama testi sonuçlarının iki kez anormal olarak sonuçlanmış olması gerekir. Aynı veya farklı bir yöntemle başka bir gün ölçümün tekrarlanması önerilir (1).

Aşikar diyabet tanısı ile normal aralıktaki kan glukoz değerleri arasındaki dönem prediyabetik dönemdir ve yüksek riskli olarak değerlendirilir.

- Bozulmuş açlık glukozu; 8 saat açlığı takiben kan glukozunun 100-125 mg/dl arasında izlenmesi,
- Bozulmuş glukoz toleransı; 75 gram glukoz ile yapılan OGTT'de 2. saat kan glukozunun 140-199 mg/dl arasında olması,
- HbA1c değerinin ise %5.7-6.4 arasında olması,

Bu üç durumdan birinin olması prediyabet döneminde tanımlanmaktadır (17).

Bu kriterleri 2020 TEMD Diyabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu'nda yer alan tabloya istinaden şu şekilde gösterebiliriz (1):

Tablo 1: TEMD'e göre Diabetes Mellitus ve Glukoz Metabolizmasının Diğer Bozukluklarının Tanı Kriterleri

	Aşikar DM	İzole BAG	İzole BGT	BAG+BGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8 sa açlıkta)	≥126 mg/dL	100-125 mg/dL	<100 mg/dL	100-125 mg/dL	-
75 gr OGTT 2.sa PG	≥200 mg/dL	<140mg/dL	140-199 mg/dL	140-199 mg/dL	-
Rastgele PG	≥200 mg/dL + diyabet semptomları	-	-	-	-
HbA1c	≥%6.5	-	-	-	%5.7-6.4
APG: Açlık Plazma Glukozu, 2.sa PG: 2. Saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobinin A1c, BAG: Bozulmuş açlık glukozu, BGT: Bozulmuş glukoz toleransı					
*TEM2020 Diyabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu'ndan alınmıştır.					

2.1.6 Sınıflandırma

TEMĐ 2020 kılavuzuna göre Diyabetes Mellitus etiyolojik sınıflandırılmasında 4 klinik tip bulunmaktadır. Bu sınıflama şu şekildedir (1):

1. Tip 1 Diyabetes Mellitus; (genellikle tam insülin eksikliğine yol açan otoimmün β hücre yıkımı nedeniyle meydana gelir.)

2. Tip 2 Diyabetes Mellitus; (sıklıkla insülin direnci zemininde, β -hücresi insülin sekresyonunun ilerleyici kaybı nedeniyle meydana gelir.)

3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM); (gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen ve gebelikten önce açıkça belirgin olmayan diyabet olarak isimlendirilir.)

4. Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet türleri; örneğin, monogenik diyabet sendromları (yenidoğan diyabeti ve gençlerde olgunlukta başlayan diyabet gibi), ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibroz ve pankreatit gibi) ve ilaç veya kimyasal maddeler kaynaklı diyabet (örneğin, glukokortikoid kullanımı, HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) tedavisinde veya nakli sonrası)

2.1.6.1 Tip 1 Diyabetes Mellitus:

β hücre yıkımının sonrasında insülin düzeyindeki azalma ile karakterizedir. Bu yıkımdan genetik, çevresel ve immünolojik faktörler sorumludur. Her yaşta görülmekle beraber, sıklıkla çocukluk yaş grubunda ortaya çıkmaktadır (18).

İmmün aracılı ve idiyopatik olmak üzere iki alt tipi vardır. İdiyopatik tip nadir görülmekle birlikte bu hastalar sıklıkla zayıf ya da normal kilodadır.

Erken klinik dönemde hiperglisemiye bağlı semptomlar ortaya çıkar. Geç dönemde tanı ve tedavisi gecikmiş hastalarda ketoasidoz ortaya çıkabilir. β hücre rezervleri, hastalığa ait temel bulguların görüldüğü dönemde çok düşüktür. Otoantikör titreleri azalır. Hastalar ekzojen insülin ihtiyacı duyarlar.

Kan şekeri kontrolünü sağlamak zorlaşır. İleri dönemde mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar gelişir. Hastaların çoğunda ölüm nedeni diyabetik nefropatidir (19).

2.1.6.2 Tip 2 Diyabetes Mellitus:

Diyabetik hastaların %90'ı bu gruptadır. Daha ileri yaşlarda görülmesine rağmen obezite artışı nedeniyle adölesanlarda ve çocuklarda da görülme sıklığı artmıştır. Genelde başlangıçta asemptomatikken hastalar kronik komplikasyonlara bağlı bulgularla başvururlar (20).

Tip 2 DM, poligenik ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik yatkınlığı belirleyen ortak bir gen saptanamamıştır. Hastalığın poligenik formlarında intestinal yağ asidi bağlayıcı protein 2 (FABP2), peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (PPAR γ), β 3 adrenerjik reseptör ve Calpain 10 mutasyonları tanımlanmıştır. Bütün bunların yanında obezite, beslenme alışkanlıkları, yetersiz mobilizasyon gibi çevresel faktörler fenotipi belirler (21).

İnsülinin hedef dokuları olan kas, yağ dokusu ve karaciğer de insüline karşı biyolojik yanıtın bozulması insülin direncidir. İnsülin, karaciğerde hepatik glukoz üretimini azaltırken, yağ ve kas dokusuna glukoz alımından ve depolanmasından sorumludur. Bu aşamada patoloji olması durumunda kan glukoz düzeyi artar. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde β hücre kapasitesinin aşılmasıyla diyabet ortaya çıkar (1).

2.1.6.3 Gestasyonel Diyabetes Mellitus:

Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM), ilk kez hamilelik sırasında tanı konan herhangi bir derecedeki glukoz intoleransı olarak tanımlanır. Gebelik tanısı konan bütün kadınlara ilk prenatal muayenede risk değerlendirmesi yapılmalıdır. Yüksek riskli gebeler (obezite, GDM öyküsü, glukozüri, anne yaşının 40'tan büyük olması, makrozomik bebek doğurma öyküsü, polikistik over sendromu (PKOS), kortikosteroid veya antipsikotik ilaç kullanımı, diyabet açısından kuvvetli aile öyküsü), en kısa sürede rastgele plazma glikozu veya açlık plazma glukozu veya HbA1c ile taranmalı; risk saptanmayan gebeler ise 24-28. gebelik haftaları arasında taranmalıdır (22).

Gestasyonel diyabet hem fetüs hem anne için uzun dönemde komplikasyonları olan bir hastalıktır. GDM tanılı kadınların doğum sonrası kan şekeri düzeylerinin normale dönmesi beklense de tip 2 DM gelişme riski artmıştır (23). Diğer gebelerle kıyaslandığında diyabetik gebelerde yandaş hastalıkların eşlik etme oranı artmıştır (24).

2.1.6.4 Spesifik diyabet tipleri :

Tip 1, Tip 2 ve gestasyonel DM dışında tek gen mutasyonları, pankreas hastalıkları, ilaç kullanımı, endokrin hastalıklar, enfeksiyonlar gibi bazı özel durumlar da diyabet nedeni olabilir. Ayrıca genetik geçişli sendromlara da diyabet eşlik edebilmektedir.

Gençlikte ortaya çıkan erişkin tip diyabet (MODY), tek gen mutasyonuna bağlıdır. Genellikle 2. dekada görülen, aile öyküsü bulunan, normal kiloda, insülin direnci olmayan erişkin başlangıçlı diyabet gibi seyreden hastalar bu gruptadır. Kan şekeri regülasyonu için insülin tedavisi genellikle gerekmez veya düşük dozlar ile regülasyon sağlanır (1).

Solid organ nakli sonrası kullanılan immünsüpresif ilaçlara bağlı da diyabet gelişebilmektedir. Tarama yapılması ihmal edilmemelidir. Ekzokrin pankreas hastalıkları, geçirilmiş pankreas cerrahisi sonrasında da diyabet tanısı açısından dikkatli olunmalıdır (25).

2.1.7 Tedavi

Sunulan tez çalışmasının konusu, esas olarak diyabetin kadın üreme sağlığını ilgilendiriyor olduğundan, burada diyabet tedavisi detaylı olarak gözden geçirilmeyecek, sadece esaslarıyla ele alınacaktır.

Diyabetes Mellitus yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen, sosyal ve ekonomik sorunlara neden olan önemli bir kronik hastalıktır. Tedavisinde multidisipliner ve sürekli bir tıbbi bakım gerekmektedir (26). Tedavide bireyin metabolik kontrolünü sağlayıp komplikasyonları azaltmak, yaşam kalitesini korumak hedeflenir (27). Tedavide amaç kan glukozu, kan lipidleri ve kan basıncını dengede tutmaktır (28).

Tablo 2: Erişkin Olgular İçin Diyabet Tedavisi Glisemik Kontrol Hedefleri (1)

	Hedef Değer
Açlık ya da Öğün Öncesi Plazma Glukozu	80-130 mg/dl
Öğün Sonrası 2. Saat Plazma Glukozu	<160 mg/dl
HbA1c değeri	<%7

Öncelikle bütüncül yaklaşımlar ile yaşam tarzı değişikliğine gidilmelidir. Tedavi modaliteleri şunlardır:

1. Yaşam tarzı değişiklikleri (bireyselleştirilmiş diyet tedavisi, egzersiz, ideal vücut ağırlığının sağlanması)
2. Oral yolla kullanılan diyabet tedavi ajanları (oral antidiyabetikler [OAD])
3. İnsülinler / insülin analogları

Tip 2 DM tedavisinde, β hücre rezervi yeterli olan hastalarda, kontrendikasyon yoksa oral antidiyabetik ilaçlar verilir. Farklı gruplardaki oral antidiyabetik ilaçlar kombine edilerek verilebilir (29).

Tablo 3:Oral Antidiyabetik Ajanlar (1)

Oral Antidiyabetik ve İnsülinomimetik İlaçlar
İnsülin duyarlılaştırıcı (sensitizer) ilaçlar
o Biguanidler
o Tiazolidindionlar
İnsülin salgılatıcı (sekretogog) ilaçlar
o Sulfonilüreler
o Meglitinidler
Alfa glukozidaz inhibitörleri (Akarboz, Miglitol)
İnsülinomimetik ilaçlar
o Amilin analogları
o Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) analogları
o Dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) inhibitörleri
Sodyum glukoz ko-transporter 2 inhibitörleri (gliflozinler, glukoretikler)

Tip 1 DM'li bireylerde, gebelerde ve oral antidiyabetik ilaçlarla kan glukozu kontrol altında tutulamayan hastalarda, insülin salgısı yetersiz Tip 2 DM'li bireylerde insülin tedavisi önerilmektedir. Bu preparatlar endojen fizyolojik salınım fazlarına benzer bir salınım üzerine üretilmiştir. Kısa, orta ve uzun etkili preparatları mevcuttur (30).

Tablo 4: Diyabet Tedavisinde Kullanılan İnsülin Formları (1)

İnsülin Tipi	Örnek
Kısa / hızlı etkili insülinler	o Regüler (kristalize) o Lispro o Aspart o Glulisin
Orta etkili insülinler	o NPH (Nötral protamin Hagedorn)
Uzun etkili (bazal) insülinler	o Glargin o Detemir o Degludec
Karışım insülinler	o Farklı insülin tiplerinin (sıklıkla kısa / hızlı etkili + uzun etkili [bazal]) farklı oranlarda (sıklıkla 30/70, 25/75 ya da 50/50) kombinasyonları

2.1.8 Deneysel diyabet oluşturma

Güncel çalışmalarda çeşitli hastalıklara tanı konması, patogenezinin anlaşılması, hastalıktan korunmanın ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel hayvan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu modeller, patolojiye genetik olarak uygun türlerin seçilebilmesine; istatistiksel değerlendirmeye yetecek kadar çok sayıda örnekle çalışılabilmesine ve değişkenlerin kontrol altında tutulmasına; birden fazla risk faktörleri ve patolojinin çalışılabilmesine; henüz denenmemiş tanı koydurucu, koruyucu veya terapötik yaklaşımların denenmesine olanak vermektedir (31).

Hayvanlarda besinlerle ya da toksinlerle istenen organlarda patoloji meydana getirilebilmektedir. Deneysel diyabet oluşturma modellerinde; fare, sıçan, tavşan, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları

kullanılabilmektedir. Diyabet oluşturulması kimyasal ajanlarla, yapılabilmektedir. Aloksan ve Streptozotosin (STZ), bu amaçla en çok kullanılan kimyasal ajanlardır (32).

Streptozotosin (STZ), pankreasta bulunan ve insülin üreten β - hücrelerinde hasar oluşturarak bu hücrelerin insülin üretme kapasitesinde azalmaya sebep olarak hiperglisemik bir durumun ortaya çıkmasına neden olan diyabetojenik bir ajandır. N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır, ışıktan korunmalı ve -20 °C de saklanmalıdır. Serum fizyolojik veya sodyum sitrat çözeltileri içerisinde hazırlanarak, en geç 15 dakika içinde enjekte edilmelidir (33). İntraperitoneal, subkutan, intravenöz (i.v) olarak verilebilir.

Aloksan ve redüksiyon ürünü olan dialurik asid, serbest radikallere dönüşür. Bu serbest radikaller pankreas beta adacığında masif kalsiyum artışına neden olarak, adacıkta toksisite oluştururlar (34). Aloksanın diyabetik doz aralığı oldukça dardır. Hafif doz artışında bile mortaliteye neden olabilir. Bu mortalitenin nedeni aloksanın böbrek tübül epitelinde toksisite yaratması ve buna bağlı böbrek yetmezliği oluşturmasıdır (35).

Diyabet oluşturmada diğer bir yöntem pankreasın total rezeksiyonudur. Cerrahi girişim gerektirmesi ve malabsorbsiyon oluşması tekniğin zor kısımlarıdır.

2.1.9 Diyabetin over ve endometrium üzerine etkisi

Diyabetes Mellitus hastanın cinsel yaşamını ve üreme sistemini etkileyebilmektedir. DM kadın üreme sisteminde insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) aracılığıyla over fonksiyonu üzerine etki eder. Çevresel faktörlerin de bu yollara eklenmesiyle over kisti oluşumunu tetiklemektedir. İnsülin sinyalindeki düzensizlik puberte, ovulasyon ve infertilite sorunlarına yol açmaktadır (36). Diyabetes Mellitus, folikül sayısını ve çapını azaltıp, atretik folikülleri artırarak overi etkiler (37).

Fibrozis, çeşitli kronik hastalıkların ilerlemesinde ortaya çıkan yaygın bir aşamadır. Yaygın over fibrozisi, kadın üreme sağlığını tehdit eden over rezervinin azalmasının temel nedenidir (38).

Over fibrozisi, overde fibroblast ve hücre dışı matriksin (ECM) aşırı birikmesi ile karakterizedir. Operasyon, enfeksiyon, kronik hastalıklar sonucu oluşan over hasarı tarafından fibrozis oluşumu tetiklenir. Over fonksiyon bozukluklarının başlıca sebebidir. Fibrozis olan hastalarda infertilite oranı artmıştır ve yardımcı üreme tekniklerine yanıt azalmıştır (38).

Diyabetes Mellitus tanılı kadınların sağlıklı kadınlara göre menstrüel düzensizlikleri daha sık yaşadığı ve daha erken yaşta menopoza girdiği bilinmektedir (39).

Açıklanamayan infertilitede suçlanan nedenlerden biri implantasyon başarısızlığıdır. Bu durumun altında da diyabet gibi metabolik süreçlerin yer alabileceği düşünülmektedir (40).

Hem embriyonik gelişim için hem de endometriumun desidualizasyonu için glukoz gereklidir, glukoz metabolizması bozukluklarında implantasyon sorunları ve gebelik kayıpları yaygındır. Erken gebelik döneminde glikojen temel bir glukoz kaynağıdır. Endometriyal glikojen düzeyi, progesteron etkisiyle luteal fazda zirveye ulaşır. Bu yükselen glikojenin embriyonik gelişme için kullanıldığı düşünülmektedir (36).

2.2 Over

Overler ilk kez gelişimin 5. haftasında mezotelyumun proliferasyonu ve altındaki embriyonik bağ dokusunun kalınlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonadal kabarıklık halinde belirir. Overi en dışta tek katlı kübik epitelden oluşmuş tabaka örter. Mikroskobik olarak bakıldığında peritona bakan yüzünde mikroskobik yapılar görülür. Epitelin altında, tunika albuginea adı verilen ve overe beyaz rengini veren sıkı bağ dokusundan oluşmuş bir tabaka bulunur (41). Yine epitelin altında korteks ve medulla kısımları bulunur.

Kortekste farklı evrelerdeki foliküller yer alırken, medullada damar, sinir ve lenfatik yapılar yer alır (42). İnsan over medullasında menstrüasyon öncesi

östrojen salgılayan, gruplar halinde bulunan epiteloit interstitial hücreler bulunur.

Uteroovaryan ligaman ile uterusu, infundibulopelvik ligaman ile de pelvik yan duvara bağlanmaktadır. Overin beslenmesi abdominal aortadan direkt dallanan ovaryan arterler tarafından sağlanmaktadır. Ovaryan damarlar pelvis giriminde eksternal iliak arteri çaprazlayarak infundibulopelvik ligaman içerisinde yol alarak over hilusundan overe dağılmaktadır. Ayrıca uterin arterin uterusu girerken dallanmasıyla oluşan vasküler anastomozlar, over ve tubanın kanlanmasına da katkıda bulunmaktadır. Ovaryan venler hilustan çıktıktan sonra, sağ ovaryan ven direkt inferior vena kavaya, sol ovaryan ven ise önce sol renal vene drene olarak inferior vena kavaya dökülür (42).

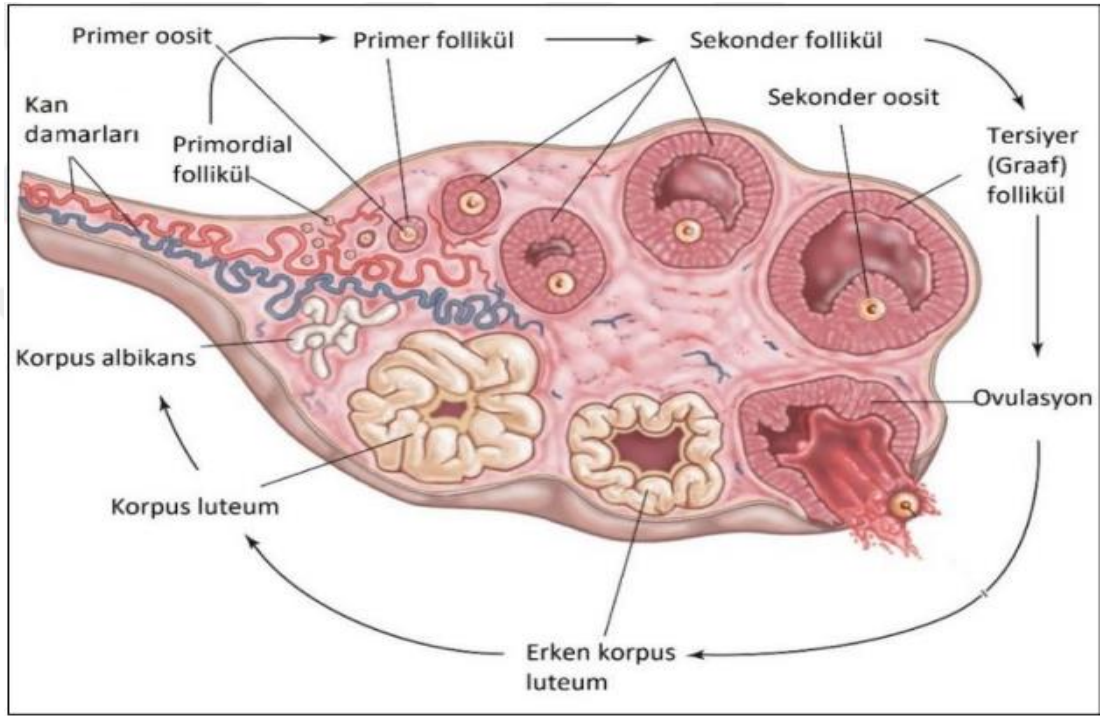
Overde foliküllerin gelişimi karmaşık ve uzun sürelidir. İntrauterin hayatta overlerde başlangıçta 7 milyon kadar olan oosit sayısı, doğuma kadar apoptozise uğrayarak 2 milyona kadar düşmektedir. Doğum sonrası puberteye kadar bu hücrelerde artış görülmemekle birlikte, atreziye uğrayarak pubertede bu sayı 400.000'e kadar düşmektedir. Kortekste bekleyen primordiyal foliküller aktif hale geçtikten sonra primer, sekonder ve tersiyer folikül olmak üzere gelişim evrelerine göre farklı foliküllere ayrılırlar (43).

İntraovaryan hücreler sitokinler, insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörleri, intörlökin 1 β gibi parakrin faktörler salgılayarak foliküllerin gelişimini denetler. Overdeki değişikliklerin çoğu hipofiz bezi ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonlar olan folikül stimulan hormon (FSH) ve lüteinize edici hormon (LH) tarafından denetlenir. Bu hormonlar overden sentezlenen hormonların pozitif ve negatif geri bildirimi ile kontrol edilmektedir (44).

Folikülogenez; oositlerin ve granüloza hücrelerinin beraber gelişip proliferasyonu olduğu süreçtir. Bu süreç, fetal yaşamda başlar, oosit büyümesi, granüloza hücrelerinin bölünmesine ve teka tabakasının gelişmesi ile devamlılığı sürdürülmektedir (45).

Foliküler aktivite hipotalamo-hipofizer eksen üzerinden düzenlenir. Her 28 günde bir overden bir oosit atılması ile ovaryan siklus tamamlanır. Ovaryan siklus; folikül gelişimin gerçekleştiği foliküler faz, gelişmiş oositin tuba

uterinalara atılımının gerçekleştiği ovulasyon fazı, geride kalan folikül dokusundan gelişen korpus luteumun bulunduğu luteal faz ve atrezi süreci olmak üzere toplam 4 ayrı fazdan oluşmaktadır (45).



Şekil 1: Ovaryan Folliküllerin Gelişim Evresi (45)

2.3 Endometrium

Endometrium uterusun tunika muskularis tabakasını düz bir örtü şeklinde kaplayan en iç tabakadır. Endometrium, bir üst fonksiyonel tabaka ve bir alt bazal tabakadan oluşur. Bazal tabaka rekonstrüksiyondan sorumludur ve fonksiyonel tabakanın oluşumunu kontrol eder (46). Arkuat arterler myometriumun orta tabakalarında dairesel şekilde yerleşmiştir. Bu damarlardan endometriumu kanlandıran iki grup damar çıkar. Bazal tabakayı kanlandıran arterler düz arterler, fonksiyonel tabakayı kanlandıran arterler spiral arterlerdir (47).

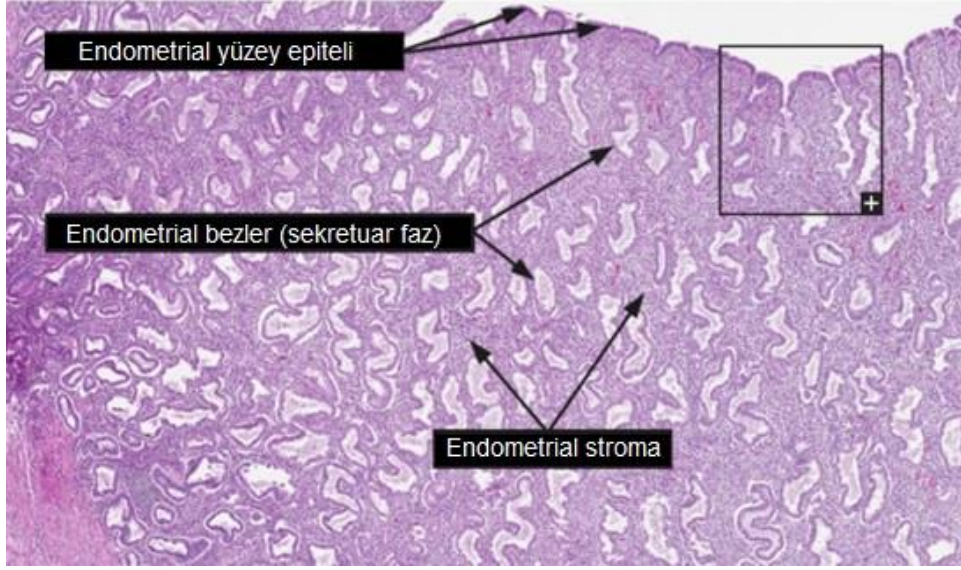
Puberte döneminde hipofiz bezi ön lobunun uyarısıyla hormonlar salgılanır ve bu, 28 günlük menstrüel döngü sırasında endometriumun çeşitli yapısal değişiklikler geçirmesine neden olur. Menstrüel döngü genelde 9-12 yaşlar arasında başlar ve 45-50 yaşına kadar sürer (48).

Gonodotropik hormonlar puberte öncesi yok denecek kadar az sentezlenir. Pubertede hipofiz bezi giderek daha çok FSH ve LH salgılamaya başlar ve menstrüel döngünün başlamasıyla en yüksek düzeye ulaşır. Salınan FSH ve LH hedef hücre üzerinde kendine özgü reseptörleri aktive ederek çoğalma hızını, büyümesini ve bu hücrelerin salgılarını artırır. Hormonal uyarı, hedef hücrelerde çeşitli enzimlerin fosforilizasyon tepkimelerini başlatarak etki etmektedir. Her menstrüel döngünün başında overde gelişmeye başlayan primer foliküller FSH ve LH hormonlarına yanıt olarak yüksek miktarda östrojen salgılar (49).

Östrojenlerin etkisiyle endometriyal bezlerde değişiklikler oluşur. Östrojenler, over foliküllerinin granüloza hücrelerinden, korpus luteum ve plasentadan salgılanır (50).

Endometrium uterusu iç yüzeyden kaplayan yenileyici ve karmaşık bir dokudur. Üreme hayatı boyunca implantasyon ve gebelik başarısından sorumludur (51). Her ay fertilize ovum implantasyonu için hazırlanır (52).

Menstrüel döngü süresince endometriumun döküntüye uğraması sonucunda ince bir stroma kalır. Döngünün ilk evresinde östrojen hormon düzeyinin hızla artması sonucu stromal ve epitelyal hücreler çoğalmaya başlar ve 4-7 gün içerisinde yüzey yeniden epitel hücreleriyle örtülür. Sonrasında endometrial kalınlık artmaya devam eder, stromal hücreler sayıca artarlar ve bezler büyür. Ovulasyona yakın zamanda endometrium kalınlığı yaklaşık olarak 3-4 mm kadardır (53).



Şekil 2:Endometriumun histolojik görünümü (54)

2.4 PRP

Tam kanın alınıp özel tüpler yardımıyla santrifüj olarak adlandırılan belirli bir süre ve devirde dönmesi sonucu tam kana göre daha fazla trombosit içeriği elde edilen plazmaya trombositten zengin plazma (PRP) denir (55).

Tam kanda %93 eritrosit, %6 trombosit ve %1 kadar da lökosit bulunur. PRP'de ise iyileşmeyi hızlandıran trombosit miktarı %94'lere kadar çıkarken eritrosit oranı %5, lökosit oranı ise değişmeden kalır. Yine PRP'de yüksek oranda büyüme faktörleri bulunur ve bu faktörler doku onarımı ve rejenerasyonu üzerine etkilidir (56). Trombositlerin α -granülleri, çevre hücreler üzerinde, özellikle mezenkimal kök hücreler (MSC) üzerinde parakrin etkiye sahip olan ve hızlı bir doku rejenerasyonunu destekleyen yüzlerce farklı protein içerir (57). PRP terapötik etkisini sitokinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri, TGF β 1, insülin benzeri büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörü 2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) içermesi ile sağlar. Bu faktörler bulundukları yerdeki kök hücrelerin yaralanma bölgesine toplanmasına yardımcı olur (58). PRP ile trombositlerin anti-inflamatuar etkisinden de faydalanılır (59). Transfüzyon amaçlı kullanılmazlar.

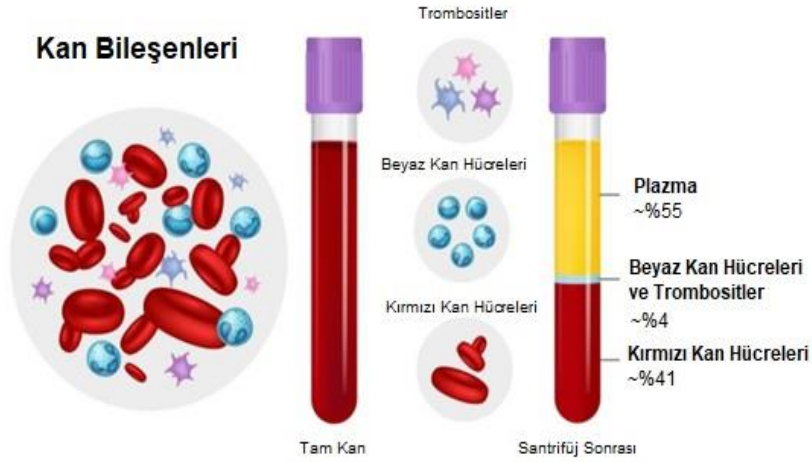
Trombositten zengin plazmada büyüme faktörleri bulunur ve bu da rejenerasyon üzerinde etkilidir (60). Yapılan çalışmalar, PRP'nin inflamasyonu, operasyon sonrası kan kaybını, enfeksiyonu, fibrozisi ve analjezik gereksinimleri azaltıp, yara ve doku iyileşmesini artırabileceğini düşündürmesi açısından umut vadedicidir (56).

PRP'nin üreme tıbbında kullanılmasıyla endometrial hücre proliferasyonunu ve endometrial kalınlığı artırdığı, fibrozisi iyileştirdiği, implantasyon olasılığını yükselttiğini gösteren çalışmalar da artmıştır (61). Özellikle IVF (In Vitro Fertilizasyon) tedavi sürecine ek olarak kullanılmaktadır (46). PRP'nin intrauterin infüzyonu araşidonik asidin prostaglandinlere dönüştürücüsü olan siklooksijenaz enzimi (COX2)'nin etkisini artırıcı yönde düzenlenmesinde, ovaryan hormonların endometrium ve endometriyal kalınlık üzerine etkilerinin oluşmasında rol almaktadır (62).

Gebelikte endometrium fonksiyonu ana etmenlerden biridir. PRP'nin zayıf endometriumu olan hastalarda endometrial gelişimi arttırmakta etkili olduğu sonucuna ulaşan çalışmalar mevcuttur (63). PRP tedavisinin endometrium histolojik yapısını düzelttiğini ve fibrozis ile ilişkili faktörlerin salınmasını azalttığını gösteren çalışmalar vardır. Bu etkiyi hasarlı endometriumda implantasyon bölge sayısını artırarak yaptığı düşünülmektedir (46). İntrauterin PRP uygulaması kronik endometrit tanılı hastalarda deneme çalışmaları olarak kullanılmaktadır. Deneysel over torsiyonu yapılan ratlarda yapılan çalışmalarda da over hasarını önlediği gösteren bulgular elde edilmiştir (64).

PRP'nin prematür ovaryan yetersizlik (POY) hastalarında over işlevini kısmen geri döndürebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu hastalarda over dokusunun restorasyonunda terapötik alternatiflerin içinde ele alınması önerilmektedir (57).

PRP enjeksiyonu pratikte sinir yaralanması, osteoartrit, kronik tendinit, kemik onarımı ve yenilenmesi, kalp kasları, yara iyileşmesi, saç dökülmesi, plastik cerrahi ve ağız cerrahisi gibi çeşitli alanlarda giderek daha fazla kullanılmaktadır, ancak kadın hastalıkları ve doğum alanında sınırlı deneyim vardır (63).



Şekil 3:PRP hazırlanması

PRP'nin başlıca avantajları, hastanın kendi kanından elde edilmesi ve elde edilmesinin kolay olması, immün yanıtlardan kaçınması ve maliyet tasarrufu sağlamasıdır (65). Bu avantajlara kolay tolere edilebilmesi, kullanılan ürün ve sağlanan etkinin uzun süreli olması, tedavi sürecinin kısmen kolay ve güvenli olması, iyileşme sürecini hızlı olması, yan etkilerinin az olması eklenebilir (66).

PRP tedavisi platelet disfonksiyonu, kritik derecede trombositopenisi olan, hipofibrinojemi tanılı hemodinamik dengesizliği olan hastalarda kontrendikedir. Septisemi riski olan hastalarda ve uygulanacak bölgede enfeksiyon olması durumunda uygulanmamalıdır (56).

2.5 AMH

Anti-müllerian hormon, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesinin bir üyesi olan gonadal hormondur (67). Transvajinal ultrasonografide görülen 2-9 mm boyutundaki foliküllerin granüloza hücreleri tarafından sentezlenir (68).

AMH geni 19. kromozomun kısa kolunda bulunan, disülfid bağlar ile birbirine bağlı homodimerik bir glikoproteindir. AMH gen ekspresyonu SOX9 tarafından indüklenir. AMHR1 ve daha yüksek afinite ile bağlandığı AMHR2 olmak üzere 2 adet reseptörü vardır (69).

Erkek fetüste müllerian kanalların gerilemesini sağlayan AMH'nin yokluğunda dişi iç üreme organları oluşur. Erkeklerde ergenliğe kadar sertoli hücrelerinde üretilir. Ergenlik sonrasında azalmaya başlar (70). Gebeliğin 2. trimesterinde (ortalama 25. Hafta civarında) AMH salınımı başlar ve menopoza kadar devam eder (68).

AMH overden salgılandığında parakrin etki göstererek büyüme faktörleri için inhibe edici özellikte olmaktadır (71). Adet döngüsüne bağlı olan ve erken over yetersizliğinde klinik olarak geç belirtiler oluşturan inhibin B, estradiol (E2) ve FSH aksine klinik olarak kullanımı kolaydır (72).

Serum AMH düzeyleri yaş ile orantılı olarak değişmektedir. AMH salınımı yalnızca granüloza hücrelerinden olduğu için bu durumun over aktivitesini yansıttığını düşündürmektedir. AMH serum düzeyi ile antral folikül sayısı da ilişkilidir ve over rezervi hakkında bilgi vermektedir (73). Serum AMH düzeyinin döngüler arası minimal oranda değişiklik göstermesi diğer over rezerv testlerine göre avantajı olarak görülmektedir (68). Serum AMH düzeyinin kronik hastalıklarla ilişkisi incelendiğinde diyabetik kadınlarda AMH düzeyinin azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. (74)

Düşük AMH düzeyine sahip kadınlarda doğurganlığın azaldığı saptanmıştır. Yüksek AMH düzeyine sahip kadınlarda da anovulasyon düşünüldüğü için yine doğurganlık oranı az saptanmaktadır. AMH düzeyinin over rezervini göstermesi ve bu yolla kadın doğurganlığı ve infertilite değerlendirilmesini sağlaması önemlidir (75). AMH düzeyinin çok düşük

olması düşük over yanıtı, kötü embriyo transferi ve kötü gebelik sonuçları ile ilişkilidir (76).

Birçok hormonun aksine AMH, her yaşta ölçülebilir düzeydedir. Prepubertal dönemde yükselme eğilimindedir. Özellikle çocukluk çağı kanserlerinde tedavi öncesi ve sonrası değerlendirilmesi ileri dönemde over fonksiyonu hakkında bilgi vermesi açısından değerlidir (75). Pubertal dönemde preantral ve antral foliküllerden salgılanır ve FSH etkisindeki folikülün büyümesini inhibe eder (77).

Serum AMH seviyesi polikistik over sendrom (PKOS)'lu hastalarda 2-3 kat artmaktadır. Bu artış foliküllerin FSH'a duyarlı hale gelmesine neden olur ve antral folikül sayısı artar. Ovulasyon inhibe olduğu için overde çok sayıda kistik folikül oluşur. AMH aromataz aktivitesini inhibe ettiği için hiperandrojenemi oluşur. Bütün bunların sonucunda adet düzensizliği, hirsutizm ve fertilité bozuklukları meydana gelir (78).

2.6 VEGF

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) homodimerik, heparin bağlayıcı özelliği olan bir büyüme faktörüdür. Glikoprotein yapıda ve 45 kilodalton (kDA) büyüklüğündedir. VEGF geni 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) bulunmaktadır (79).

Damar endotel hücrelerine özgü yapısı sayesinde vasküler geçirgenliği artırarak fizyolojik ve patolojik süreçlerde (kanser, inflamasyon, oksidatif stres gibi) rol oynar. Anjiyogenez, lenfanjiogenezde rol oynamaktadır (80). VEGF düzeylerinin aşırı yükselerek damarsal endotelde geçirgenliği ve zayıflığı artırması patolojik süreçlerde sorumlu tutulan mekanizmadır. VEGF'in mitojenik aktivitesi de damar endotel hücreleri ile sınırlıdır. Trombositlerde depo edilir. Over folikülleri, lökosit, megakaryosit, korpus luteum, hepatositler, malign hücrelerde sentezlendiği düşünülmektedir (81).

3 tirozin kinaz, 2 nötrofilin reseptörü olmak üzere 5 adet VEGF reseptörü bulunmaktadır (79). VEGF reseptörleri nerdeyse tamamen endotelial hücrelerden salınır (82).

VEGF gen ailesi 7 üyeden oluşmaktadır. Bu ailenin üyelerinin her birinin farklı damarlar üzerine etkisi vardır. VEGF-A insan uterus epitelyal ve stromal hücrelerinde eksprese edilir ve östrojen tarafından regüle edilmekle birlikte plasentasyonda sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer aile üyeleri de monosit farklılaşması, lenfanjiogenez, endotel hücre proliferasyonu gibi rollerde yer almaktadır.

Nitrik oksit ve prostasiklinler aracılığı ile vazodilatasyona sebep olan VEGF, endotel hücre proliferasyonunu artırır, hücre göçünü uyarır ve apoptozisi inhibe eder (83).

Büyümeyi ve neovaskülarizasyonu artıran VEGF hem over hem endometriumda sentezlenir. Over hacmi ve bazal antral folikül sayısı VEGF ile doğru orantılıdır (38). Overde granüloza ve teka hücrelerinde üretilir, gonadotropinlere ve hipoksiye yanıt olarak artar (84). Overde folikül büyümesi ve çap artışı VEGF ile ilişkilidir (37). Endometrial VEGF düzeyi menstrüel siklusun fazlarına göre değişim göstermektedir (85). Endometrial VEGF düzeyinin desidualizasyon ve implantasyonda önemli olduğu düşünülmektedir. VEGF üretimi gebelik oluşumunda ve plasentasyonda rol oynamaktadır (86).

VEGF'in istenmeyen etkilerinden biri tümör anjiogenezisidir. Serumda yüksek seviyelerde bulunması damarsal yapıyı aşırı derecede geçirgen ve zayıf kılmaktadır. Bu durumun da tümör büyümesi ve yayılmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir (87). Glisemik kontrol ve diyabetin mikrovasküler hasarında VEGF düzeylerinin önemli olduğu düşünülmektedir (88).

2.7 TGF- β

TGF- β , hücre çoğalması ve farklılaşmasını, yara iyileşmesini, anjiyogenezi ve bağışıklığı düzenlemede çeşitli rollere sahip profibrotik bir sitokindir (89). Trombosit degranülasyonu sonucu salgılanarak yara yerine göç eder. Hiperglisemi, overde stromal ve foliküler dejenerasyona TGF- β aktivasyonu yaparak sebep olur. Bunun sonucunda da fibrozis ortaya çıkar (37). Kolajen birikimine neden olarak dokularda fibroze neden olduğu da düşünülmektedir (37).

TGF- β endometriumda bezler aracılığı ile hormonal etki altında salınır. Endometriozis tanılı kadınların periton sıvısına TGF- β ekspresyonu, endometriozis oluşumunda önemli olabileceğini düşündürür (90).

Overde TGF- β 1 düzeyinde anormal artışlar foliküler displaziye ve ovulasyon yetmezliğine neden olabilir (38). MessengerRNA (mRNA) anormal artışına bağlı olarak teka-interstisyel hücrelerin aşırı büyümesi teşvik edilir, bu da androjen üretiminin artmasına neden olarak PKOS gelişiminde de suçlanmaktadır (38). Overde FSH reseptör sentezinde görev almaktadır. Primordiyal folikülden primer foliküle geçiş aşamasındaki regülasyonda görev almaktadır (91).

Endometriumda endometrial hücre ve makrofajlar tarafından TGF- β salgılanması endometriozis patolojisinde suçlanmaktadır (92).

Endometriyal desidualizasyonda, uterin immün cevapta görev alır. Menstrüasyonda ve endometriyal rejenerasyonda görev almaktadır (91).

2.8 PENTRAXİN-3

Pentraxinler birçok canlıda varlığı gösterilen ve proteinlerin bir üst ailesi olan süper proteinler olarak adlandırılırlar (93).

Pentraxin-3 (PTX3), uzun pentraksin ailesinin bir üyesidir. PTX3, endotel hücreleri, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri gibi aterosklerotik lezyonlarda üretilir ve bu durum lokal inflamasyonu yansıtır (94).

İnterlökinler, tümör nekroz faktörü (TNF) gibi proinflamatuvar sinyaller PTX3 üretimine yol açar (94). Bu marker erken over yetersizliği üzerinde diyabet komplikasyonlarının saptanmasında kullanılabilir (94).

PTX3'ün insan doğurganlığındaki rolü bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda bağışıklık yanıtında ve farelerde dişi doğurganlığında önemli olduğu saptanmıştır. PTX3'ün foliküllerde kümülüs ooforus oluşumunda ve implantasyon ve desidualizasyonda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Evrimleşme sürecinde korunduğu düşünülmekle birlikte insan üremesinde de önemli olduğu düşünülmektedir (95). PTX3 insanlarda oosit kalitesini göstermek için bir marker olarak önerilmektedir (96).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez projesi Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28/09/2021 tarih, 202 numaralı onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan malzemeler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022-017 no'lu tez projesinden sağlanan gelir ile temin edildi. Çalışmamızın histomorfolojik değerlendirilmesi, alınan örneklerin ışık mikroskopları altında değerlendirilmesi, uygun histolojik yöntemler kullanılarak immünohistokimyasal incelemesi ve ELISA analizi Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Çalışma gruplarının oluşturulması

Çalışma kapsamındaki hayvan deneyleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Çalışmada 32 adet 8 haftalık, dişi, 180-290 gr ağırlığında Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Çalışma süresince hayvanlar stabil koşullar altında (22 ± 2 ° C sıcaklık ve 12/12 saat aydınlık karanlık döngüsü) tutuldu. Kuru pellet yem ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Çalışmada yer alan Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken, İzotonik grubuna intraperitoneal serum fizyolojik uygulandı. Diyabet yapılan 2 gruptan birine intraovaryan ve intraendometrial PRP uygulandı. Çalışma toplam 4 grup halinde yürütüldü;

Sıçanlar her bir grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve toplam 32 sıçan kullanıldı:

Grup1: Kontrol grubu; bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. (n:8)

Grup2: İzotonik grubu; bu gruptaki sıçanlara sadece iğne ile intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi. (n:8)

Grup3: STZ grubu; bu gruptaki sıçanlara 50mg/kg STZ uygulandı. (n:8)

Grup4: STZ + PRP grubu; bu gruptaki sıçanlara 50mg/kg STZ ile diyabet oluşturulduktan sonra PRP uygulaması yapıldı. (n=8)

3.2. Deneyisel Diyabet Modeli Oluşturulması ve Trombositten Zengin Plazma (PRP) eldesi

Diyabet modeli oluşturulması amacı ile diyabetik gruptaki hayvanlara tek doz şeklinde, taze hazırlanmış %0.9 izotonik tuz solüsyonunda çözdürülen 50 mg/kg Streptozotosin (STZ) intraperitoneal olarak verildi. STZ uygulandıktan bir gün sonra açlık kan şekeri 250 mg/dL ve üzeri olanlar sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. Ardından sıçanlar PRP uygulaması için 4 hafta bekletildi (97).

Grup I: Bu gruptaki deneklerin (n=8) 4 haftalık süre boyunca her hafta ağırlıkları tartıldı. Bu gruptaki deneklere herhangi bir işlem uygulanmadı. Sakrifiye edilmeden önce ELISA analizi için kalpten kan alındı ve daha sonra denekler sakrifiye edilip uterus ve ovaryumları histolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin parafin doku takibi protokolüne uygun olarak takip edildi ve parafin blok halinde gömüldü.

Grup II: Bu gruptaki deneklere sadece intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi (n=8). Ardından hiçbir işlem uygulanmadı. Denek grubun diğer gruplarla eş zamanlı olarak 4. haftaya kadar her hafta ağırlıkları tartıldı. Ardından sakrifiye edilmeden önce ELISA analizi için kanları alındı ve daha sonra denekler sakrifiye edilip uterus ve ovaryumları histolojik inceleme için toplandı. %10'luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin parafin doku takibi protokolüne uygun olarak takip edildi ve parafin blok halinde gömüldü.

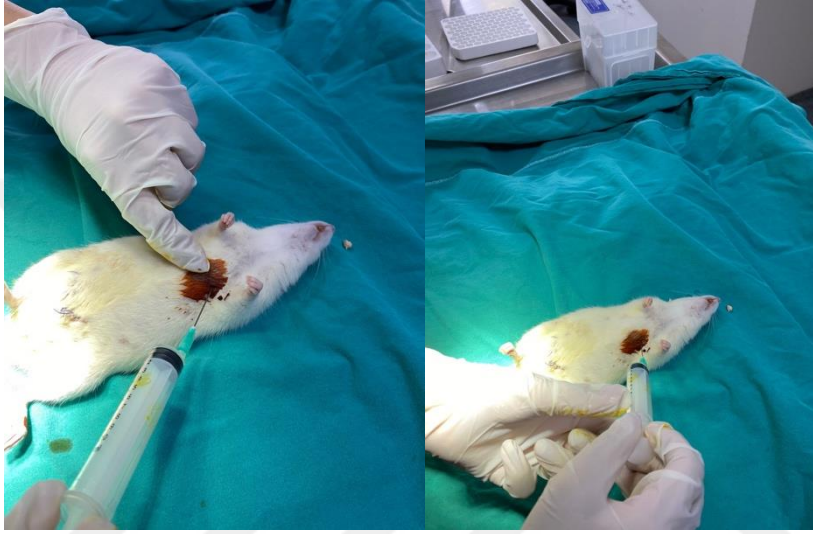
Grup III: Bu gruptaki deneklere tek doz şeklinde, taze hazırlanmış %0.9 izotonik tuz solüsyonunda çözdürülen 50 mg/kg Streptozotosin (STZ)

intraperitoneal olarak verilerek diyabet oluşturuldu. STZ uygulandıktan bir gün sonra açlık kan şekeri glukometre ile ölçüldü, 250 mg/dL ve üzeri olanlar diyabet kabul edildi. Ardından denek grup diğer gruplarla eş zamanlı olarak 4. haftaya kadar her hafta ağırlıkları tartıldı. Ardından sakrifiye edilmeden önce ELISA analizi için kanları alındı ve daha sonra denekler sakrifiye edilip uterus ve ovaryum dokuları histolojik inceleme için alındı. %10'luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin parafin doku takibi protokolüne uygun olarak takip edildi ve parafin blok halinde gömüldü.

Grup IV: Bu gruptaki deneklere tek doz şeklinde, taze hazırlanmış %0.9 izotonik tuz solüsyonunda çözödürölen 50 mg/kg Streptozotosin (STZ) intraperitoneal olarak verilerek diyabet oluşturuldu. STZ uygulandıktan bir gün sonra açlık kan şekeri glukometre ile ölçüldü, 250 mg/dL ve üzeri olanlar diyabet kabul edildi. Bu gruptaki sıçanlara 4 hafta sonra PRP, intraovaryan ve intrauterin uygulandı. Ardından denek grup diğer gruplarla eş zamanlı olarak 4. haftaya kadar her hafta ağırlıkları tartıldı. Ardından sakrifiye edilmeden önce ELISA analizi için kanları alındı ve daha sonra denekler sakrifiye edilip uterus ve ovaryum dokuları histolojik inceleme için alındı. %10'luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin parafin doku takibi protokolüne uygun olarak takip edildi ve parafin blok halinde gömüldü.

PRP eldesi amacıyla 5 adet dişi sıçana genel anestezi (10mg/kg ksilazin ve 75mg/kg ketamin) uygulandı. Klemple ayak içlerine bastırarak ağrı refleksi kontrol edildi, refleks kaybolduğunda anestezinin derinliğinden emin olundu. Deney levhasına sabitlenen deneklerden steril insölin enjektörü ile kardiyak kanları alındı (Şekil 4). Ötenazileri gerçekleştirilen farelerin kan örnekleri (500 µl-1 ml) antikoagölan içeren tüplere alınıp 2100 RPM'de 10 dakika santriföj edildi. PRP fraksiyonu toplanıp 6 dakika boyunca ikinci kez 4000 RPM'de santriföj edildi. Daha sonra PRP fraksiyonu 0,5 ml/kg oranında diyabet oluşturulan Grup 4 sıçanlarına 4 hafta sonra genel anestezi altında (10mg/kg ksilazin ve 75mg/kg ketamin) batikon ile alt abdomen temizlendikten sonra 2-3 cm'lik transvers kesi açılarak intraovaryan ve intrauterin olarak uygulandı. Deneklerin 48 saat boyunca analjezi ve antibiyoterapisi sağlanıp günlük yara yeri bakımı yapıldı. PRP uygulamasından 48 saat sonra sıçanlardan genel

anestezi altında (10mg/kg ksilazin ve 75mg/kg ketamin) ELISA analizleri için kan örnekleri alındı. Sonrasında batın bölgesi cilt, cilt altı geçilerek açıldı. Uterin hornlar takip edilerek ovaryumlar bulundu. Histopatolojik değerlendirme için her deneğin ovaryum ve uterusları alındıktan hemen sonra %10'luk formalin bulunan kaplar içerisine aktarıldı. Daha sonra sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.



Şekil 4:PRP eldesi ve ELISA analizleri için denek sıçanlardan kardiyak kan alımı.

3.3. Histolojik Analiz

3.3.1. Doku Takibi

Histopatolojik değerlendirme için tespit edilen endometrium ve ovaryum dokuları, rutin parafin doku takibi protokolüne uygun olarak takip edildi ve parafin blok halinde gömüldü. Kısaca, 48 saat %10'luk formalin ile tespit edilen doku örnekleri bir gece akarsu altında bırakılarak yıkandı. Derecesi giderek artan etil alkol serileri ile (%60-70-80-90-96) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) dehidratasyonları yapıp, iki değişim ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ile şeffaflaştırmaları sağlanıp, parafine (Surgipath, Cambridgeshire, UK) emdirme aşamasından sonra parafine gömüldü (Tablo 5).

Tablo 5:Parafin Takip Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Tespit	%10'luk Formalin	48 saat
Dehidratasyon	%60 Alkol	½ saat
	%70 Alkol	½ saat
	%80 Alkol	½ saat
	%90 Alkol	½ saat
	%100Alkol	1 saat
	%100Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Alkol–Ksilen	½ saat
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
İnfiltrasyon	Ksilen–Parafin	½ saat
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Tüm gruplara ait parafin bloklardan rotary mikrotomla (RM 2135, Leica) polilizin ile kaplı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Ardından kesitler hematoksilen ve eozin (Tablo 6) ile histolojik olarak değerlendirildi.

İmmunhistokimyasal olarak ise VEGF, TGF β , AMH ve PENTRAXİN-3 immunreaktiviteleri değerlendirildi.

3.3.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Alınan 5 μ m'lik parafin kesitler, bir gece 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile kimyasal deparafinizasyon yapıldı. Ardından rehidratasyon işlemi için kesitler %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra beş dakika akan su altında bekletildi. Kesitler beş dakika hematoksilen (Invitrogen, Paisley, UK) ile boyadıktan sonra, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için beş dakika akan suda bekletildi. Asit-alkole batır çıkar yapıldıktan sonra beş dakika akar su altında yıkandı. Üç dakika eozin (Surgipath, Cambridgeshire, UK) ile boyandıktan sonra beş dakika akan su altında yıkama yapıldı. Sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilerek havada kurutuldu. Son olarak 30 dakika ksilende bekletildikten sonra kesitler entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany) kullanılarak lamel ile kapatıldı (Tablo 6). Işık mikroskopunda (Olympus X-40) incelenip gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 6:Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ALKOL	1 DAKİKA
	HAVADA	1-2 DAKİKA
KURUTMA		
KAPAMA	KSİLEN ENTELLAN	30 DAKİKA

3.4. İmmunohistokimyasal Yöntem:

Avidin-Biyotin-Peroksidaz tekniği ile İndirek İmmünhistokimyasal Yöntem: Alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde bekletildi. Deparafinizasyon işlemini takiben kesitler iki değişim ksilen ile muamele edildi. Rehidratasyon için azalan alkol serilerinden (%96-90-80-70-60) geçirildi. Distile su ile 10 dakika yıkandıktan etrafı hidrofobik özellikli doku kalemi (pappen) ile sınırlandırılan dokular fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 3

defa 5'er dakika yıkandı. Kesitler %0,5'lik tripsin (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA) solüsyonu içinde 37°C de 10 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) (Merck, Darmstadt, Germany) uygulandı. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkanan dokular, bloklama amacıyla bir saat bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra anti-VEGF, anti-TGFβ, anti-AMH ve anti-Pentraxin-3 primer antikorum ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. PBS ile 3 defa yıkanan kesitler biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikor (Histostain Plus Bulk Kit; Invitrogen, Paisley, UK) ile 30 dakika muamele edildi. PBS ile yıkama işleminden sonra kesitlere 30 dakika streptavidin (Histostain Plus Bulk Kit; Invitrogen, Paisley, UK) uygulandı. İmmunoreaktivitenin görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) (DAB Plus Substrate Kit; Invitrogen, Paisley, UK) ile 5 dakika boyanan kesitlerin, artalan boyaması ise Mayer's hematoksilen (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA) ile sağlandı. %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler, 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. Dokular ışık mikroskopunda (Olympus X-40) incelendi. Örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda incelenerek immunreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak belirlendi ve değerlendirme HSCORE analizi ile yapıldı.

Tablo 7:İmmunhistokimya Boyama Protokolü Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
Dehidratasyon	%95 alkol	2 dakika
	%80 alkol	2 dakika
	%70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Hidrofobik kalem	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Enzimatik reaksiyon	Tripsin	10 dakika 37°C
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Endojen Peroksit İnaktivasyonu	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Protein-Blok	1 saat

Antikor ile inkübasyon	Anti-VEGF, Anti- TGF β , Anti-AMH, Anti- Pentraxin- 3	1 gece +4°C
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin-HRP	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kromojen	DAB	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Artalan Boyama	Harris' hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

3.5. Elisa Yöntemi:

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun olarak hazırlandı. Kullanmadan önce tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildi. Deney, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2. Hazırlanan standartlar her bir kuyucuğa 50 μ l olarak eklendi. Not: Standart solüsyonun biyotinlenmiş antikor içermesi sebebi ile bir sonraki aşamada bu kuyucuklara antikor eklenmedi.

3. Her gruptan 6 hayvana ait serum örnekleri kuyucuklara 40 µl olarak eklendi ve ardından 10 µl VEGF, PENTRAXİN 3 ve TGFβ antikorları kuyucuklara ilave edildi. Hemen ardından tüm serum örneklerinin ve standartların yer aldığı kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP konuldu. (Kör kuyucuğuna konulmadı). Ardından örnekler 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonrası örnekler 5 kez yıkandı.

6. Daha sonra her kuyucuğa sırası ile 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B solüsyonları eklendi ve karanlık ortamda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.

7. Stop solüsyonu eklenerek sarı renk oluşumu gözlemlendikten sonra spektrofotometre (Biotek, ELX800UV) cihazında 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak absorbans değerleri kaydedildi.

3.6. Histomorfolojik Skoring:

Her bir grup için rastgele seçilen preparatlardan, hücrelerin boyanma şiddetlerine göre 0-3 arası (0-boyanma yok, 1-az, 2- orta, 3-çok) skoringleri yapıldı. Değerler istatistiksel olarak analiz edildi, fotoğrafları çekildi.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme:

Veriler, IBM SPSS Statistics 22.0 versiyonu kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıkları tespit etmek için, normal dağılım gösteren verilerde One-way ANOVA testi kullanıldı. One-way ANOVA testi sonuçları, anlamlı farklılık gösteren değişkenler için varyans homojenliği sağlanan durumlarda Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Varyans homojenliği sağlanamayan durumlarda ise Games-Howell testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. $p < 0.001$, istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı olarak kabul edildi.

IV. BULGULAR

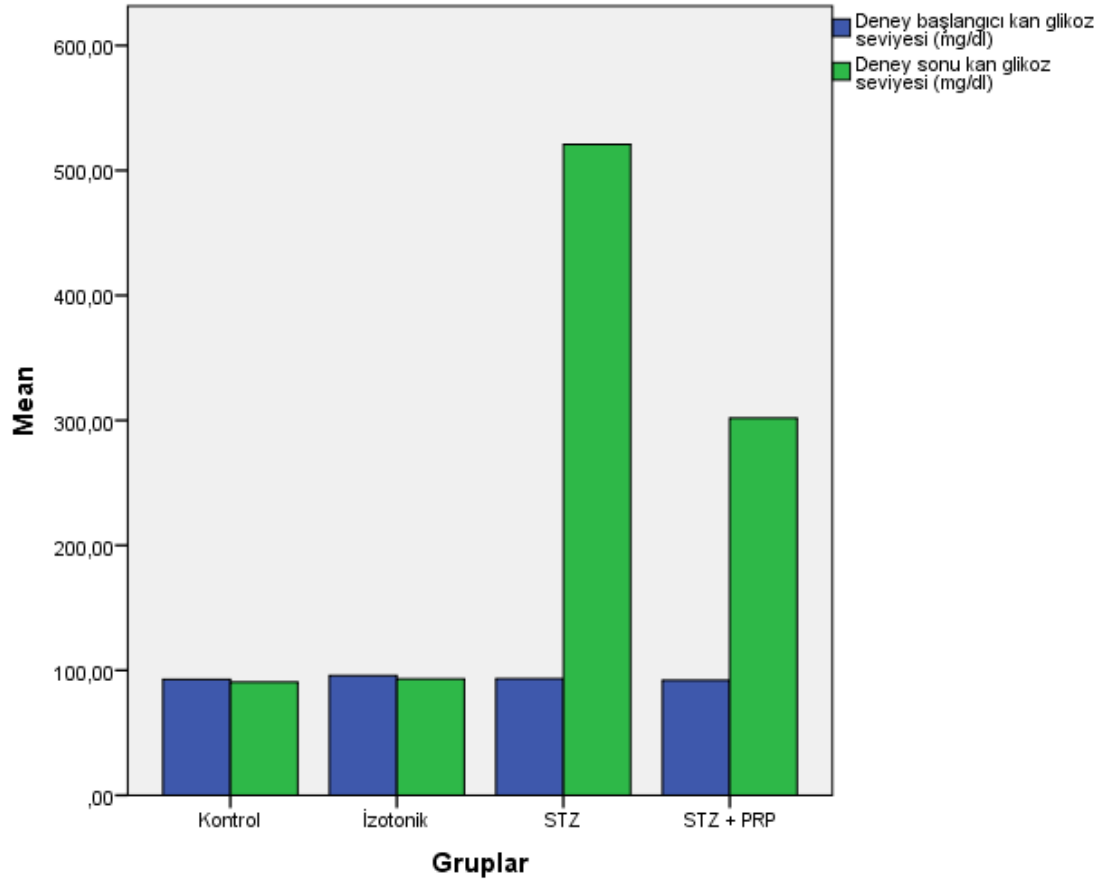
4.1. Kontrol ve diyabet gruplarına ait kan glukoz değişimleri

Kan glukoz değerleri deney başlangıcında Kontrol grubunda $92,75 \pm 9,28$ mg/dl, İzotonik grubunda $95,75 \pm 9,83$ mg/dl, STZ grubunda $93,25 \pm 7,55$ mg/dl, STZ + PRP grubunda $92,00 \pm 10,15$ mg/dl iken; deney sonunda Kontrol grubunda $90,62 \pm 7,17$ mg/dl, İzotonik grubunda $93,12 \pm 10,86$ mg/dl, STZ grubunda $520,87 \pm 103,23$ mg/dl, STZ + PRP grubunda $301,87 \pm 97,33$ mg/dl olarak değişmiştir ($p < 0.001$).

Tüm gruplara ait deney başlangıç ve deney sonu kan glukoz ve vücut ağırlık değişim değerleri Tablo 8 ve 9'da verilmiştir. Kontrol grubu ve İzotonik grubu deneklerinde kan glukoz değerlerinde anlamlı bir değişiklik izlenmedi (Şekil 5). Bunun yanında STZ grubu ve STZ + PRP grubunda kan glukoz seviyesinde istatistiksel olarak önemli artışların olduğu izlendi (Şekil 5) ($p < 0,001$).

Tablo 8:Deney Gruplarına Ait Deneklerde Kan Glukoz Değişimleri

	Deney Başlangıcı Kan Glukoz Seviyesi (Mg/Dl)	Deney Sonu Kan Glukoz Seviyesi (Mg/Dl)	P Değeri
KONTROL	$92,75 \pm 9,28$	$90,62 \pm 7,17$	0,60
İZOTONİK	$95,75 \pm 9,83$	$93,12 \pm 10,86$	0,58
STZ	$93,25 \pm 7,55$	$520,87 \pm 103,23$	<0,001
STZ+PRP	$92,00 \pm 10,15$	$301,87 \pm 97,33$	<0,001



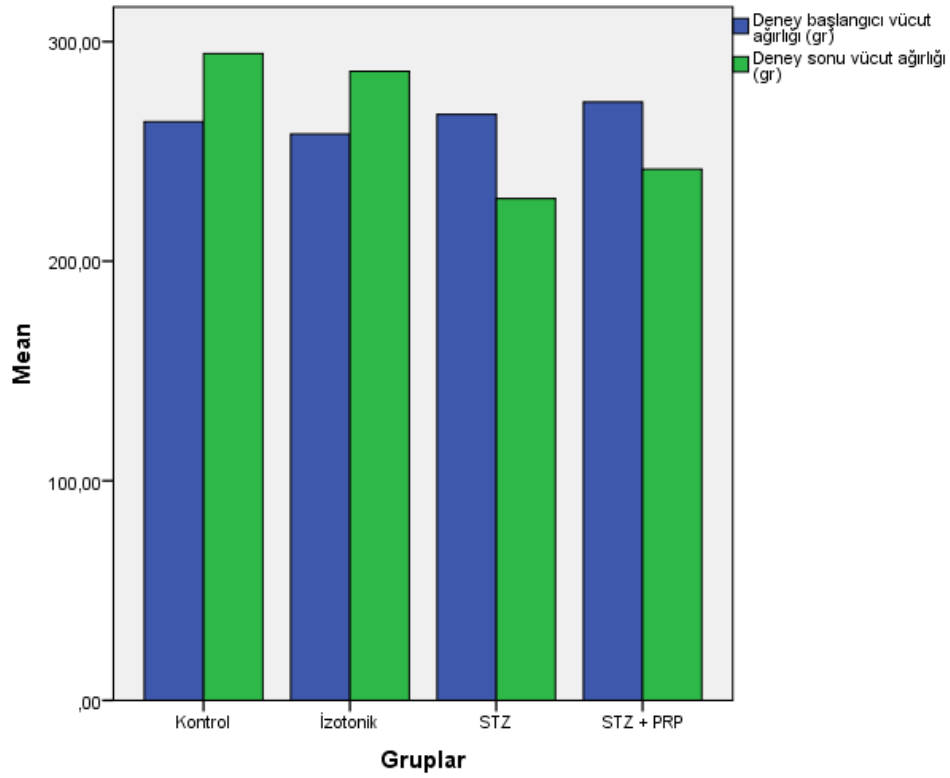
Şekil 5:Deney Gruplarına Ait Deneklerde Kan Glukoz Değişimleri

Grupların vücut ağırlık değişimleri deney başlangıcında Kontrol grubunda $263,50 \pm 21,08$ gr, İzotonik grubunda $257,87 \pm 15,84$ gr, STZ grubunda $266,87 \pm 20,10$ gr, STZ + PRP grubunda $272,50 \pm 11,64$ gr iken; deney sonunda Kontrol grubunda $294,50 \pm 19,78$ gr, İzotonik grubunda $286,50 \pm 13,37$, STZ grubunda $228,50 \pm 24,46$ gr, STZ + PRP grubunda $241,87 \pm 19,58$ gr olarak saptanmıştır ($p < 0.001$) (Tablo 9).

Vücut ağırlık değişimleri ise Kontrol ve İzotonik gruplarında artış gösterirken, STZ ve STZ + PRP gruplarında azalmanın olduğu izlendi. Tüm gruplar incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,001$) (Şekil 6).

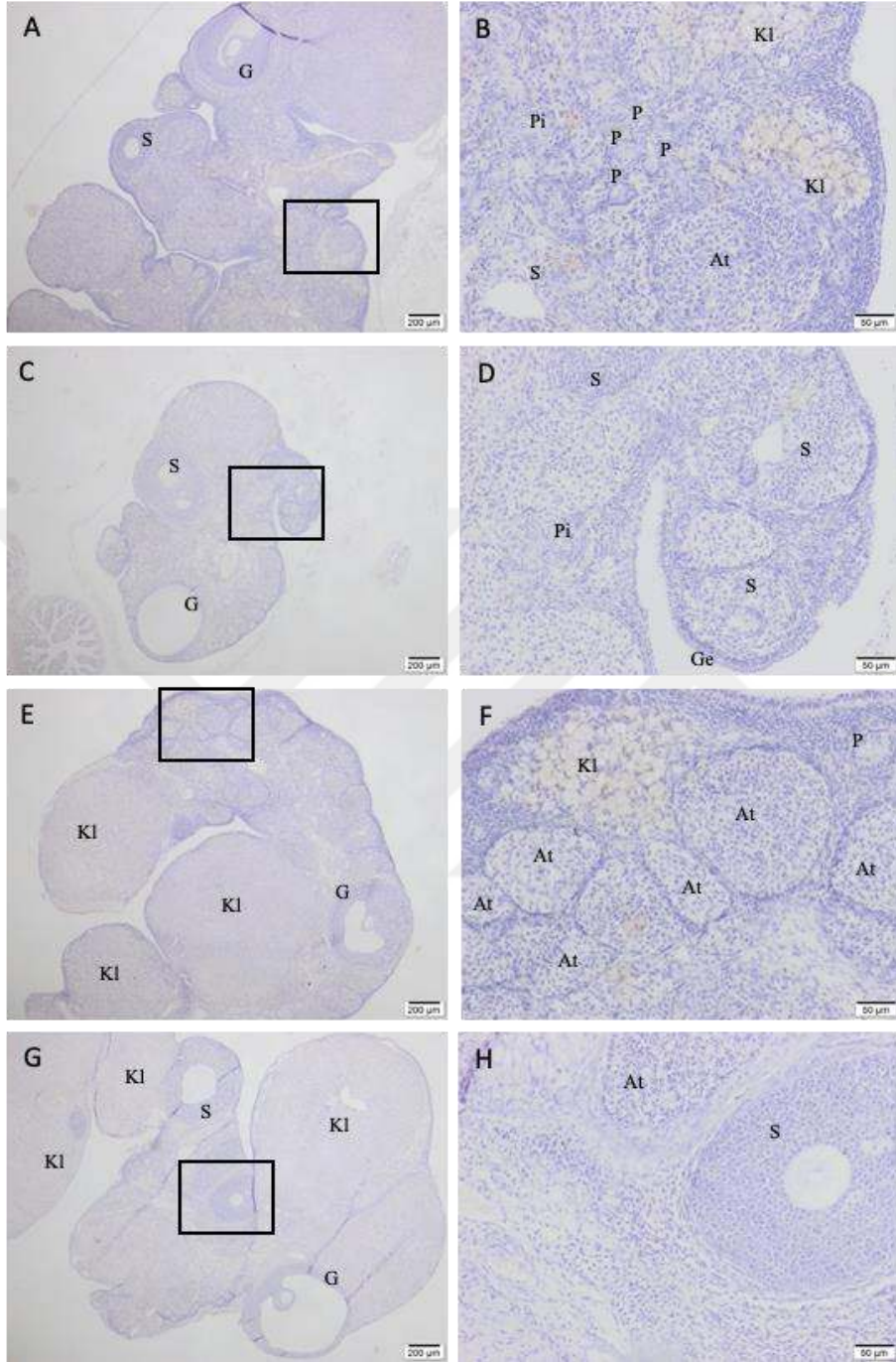
Tablo 9:Deney Gruplarına Ait Deneklerde Vücut Ağırlık Değişimleri

	Deney Başlangıcı Vücut Ağırlığı (Gr)	Deney Sonu Vücut Ağırlığı (Gr)	P Değeri
KONTROL	263,50 ± 21,08	294,50 ± 19,78	<0,001
İZOTONİK	257,87 ± 15,84	286,50 ± 13,37	<0,001
STZ	266,87 ± 20,10	228,50 ± 24,46	<0,001
STZ+PRP	272,50 ± 11,64	241,87 ± 19,58	<0,001



Şekil 6:Deney Gruplarına Ait Deneklerde Vücut Ağırlık Değişimleri

4.2. Histolojik Bulgular:



Şekil 7:Ovaryum Hematoksilen ve Eozin boyaması.

Kontrol grubu (A, B) ve İzotonik uygulanan grup (C, D), STZ uygulanan grup (E, F) ve STZ+PRP uygulanan grup (G, H). Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H : 50 µm.

Pi: primordial follikül P: primer follikül, S: sekonder follikül, G: graaf follikülü, At: atretik follikülü, Kl: Korpus luteum.

4.2.1 Over:

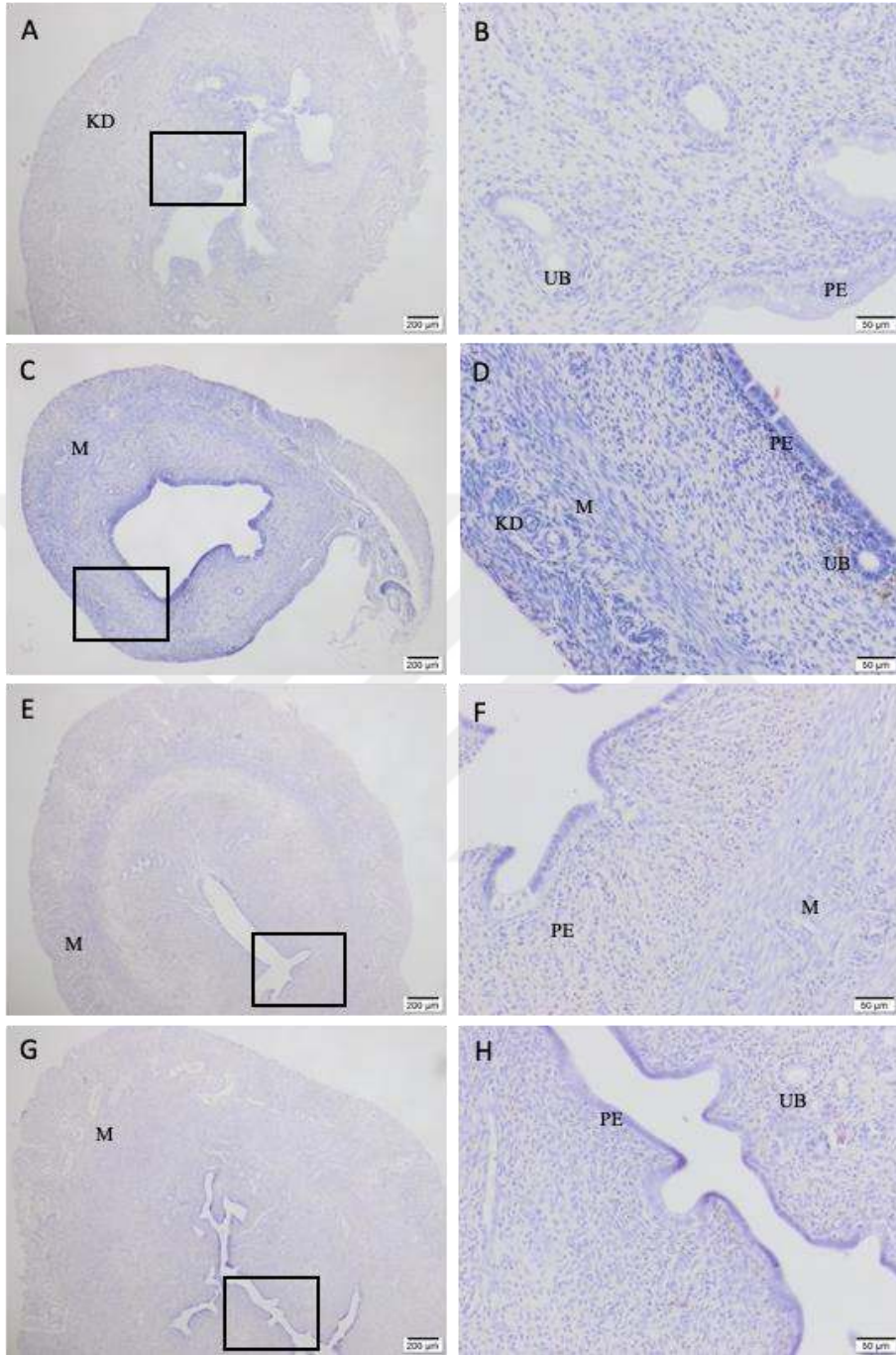
4.2.1.1 Over Korteksi:

İncelenen Kontrol, İzotonik, STZ, STZ+PRP grubu örneklerinde ovaryum dokusuna ait tunika albuginea tabakası izlendi. Tunika albuginea tabakası normal görünümde olmakla birlikte tek katlı kübik epitel ve altında bağ dokusu yapısı ile karakterize idi. Bunun yanında kontrol grubu ovaryum dokularının korteksinin histolojik olarak normal görünümde olduğu belirlendi (Şekil 7A, B). Ayrıca primordiyal, primer, sekonder ve graaf folikülleri kortekste gözlemlendi. İzotonik uygulanan gruptaki ovaryum dokusuna ait korteks, Kontrol grubu ile benzer histolojik yapıya sahip idi (Şekil 7 C, D).

STZ uygulanan gruba ait korteks dokusunda primordial, primer, sekonder ve graaf folikülleri izlenirken atretik folikül sayısında artışın olduğu belirlendi (Şekil 7 E, F). STZ+PRP grubuna ait ovaryum dokularının Hematoksilen ve eozin boyamasında, ovaryumun korteksinde primordiyal, primer, sekonder ve graaf folikülleri gözlemlendi. Yer yer atretik foliküller izlenmiş olup kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 7 G, H). Histolojik incelemeler sonucunda STZ uygulanan grupta özellikle atretik folikül sayısının kontrol ve izotonik uygulanan grup ile kıyaslandığında belirgin düzeyde arttığı bulunurken, PRP uygulaması sonunda atretik folikül sayısının azaldığı gözlemlendi.

4.2.1.2 Over Medullası:

İncelenen kontrol grubunun ovaryum dokusuna ait medulla gevşek bağ dokusu yapısındaydı ve yer yer kan damarları görüldü. (Şekil 7 A, B). Bunun yanında kontrol grubu ovaryum dokularının medullasının histolojik olarak normal görünümde olduğu belirlendi. İzotonik uygulanan gruptaki ovaryum dokusuna ait medulla kontrol grubu ile benzer histolojik yapıya sahip idi (Şekil 7 C, D). STZ uygulanan grubun ovaryum dokusuna ait medulla incelemesinde kan damarlarının azaldığı, gevşek bağ dokusunun yerini fibrotik dokunun aldığı görüldü (Şekil 7 E, F). STZ+PRP grubuna ait medulla incelendiğinde yer yer fibrozisin devam ettiği, ancak STZ grubuna göre belirgin azalmış olduğu görüldü (Şekil 7 G, H).



Şekil 8:Uterus Hematoksilen ve Eozin boyaması

Kontrol grubu (A, B) ve İzotonik uygulanan grup (C, D), STZ uygulanan grup (E, F) ve STZ+PRP uygulanan grup (G, H). Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H : 50 µm.

PE: Prizmatik epitel, UB: Uterine bezler, M: miyometriyum, KD: Kandamari.

4.2.2 Endometrium:

İncelenen Kontrol, İzotonik, STZ, STZ+PRP grubu örneklerinde uterus dokusuna ait doku bütünlüğünün korunduğu görüldü. Endometrium ve myometrium tabakaları ise tüm gruplarda kolaylıkla ayırt edildi (Şekil 8). Kontrol ve izotonik uygulanan grupta ise endometrial hücreler normal görünümde idi. STZ uygulanan grupta ise, endometrium tabakasının epitel devamlılığının bozulduğu izlendi. Ayrıca prizmatik hücrelerinde vakuol sayısının arttığı belirlendi. STZ+PRP uygulanan grupta ise yer yer hücrelerde vakuollere rastlanırken epitel bütünlüğünün STZ uygulanan gruba göre daha iyi olduğu gözlemlendi (Şekil 8).

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular:

4.3.1. Ovaryumda AMH immünreaktivitesi

Çalışmaya ait Kontrol, İzotonik, STZ ve STZ+PRP uygulanmış gruplarda gerçekleştirilen immünhistokimya analizine göre, Kontrol grubu ve İzotonik uygulaması yapılan grupta AMH immünreaktivitesi zayıf şiddette (+) idi (Şekil 9 A, B, C, D). Bunun yanında STZ uygulanan gruptaki graaf foliküllerinin granüloza hücrelerindeki AMH immünreaktivitesinin yokluğu dikkat çekiciydi (Şekil 9 E, F). En yüksek AMH immünreaktivitesi ise STZ+PRP uygulanmış grupta yer alan granüloza hücrelerinde orta derece (++) olarak izlendi (Şekil 9 G, H).

Ayrıca interfoliküler alanda AMH immünreaktivitesi incelendiğinde, Kontrol ve İzotonik uygulanan grupta hafif (+) düzeyde immünreaktivite görüldü. STZ ve STZ+PRP uygulanan grupta ise orta derecede (++) immünreaktivite belirlendi (Şekil 9). STZ ve STZ+PRP uygulanan grup folliküllerinde teka interna ve teka eksterna bölümlerinde AMH immünreaktivitesi orta derecede (++) tespit edildi (Şekil 9).

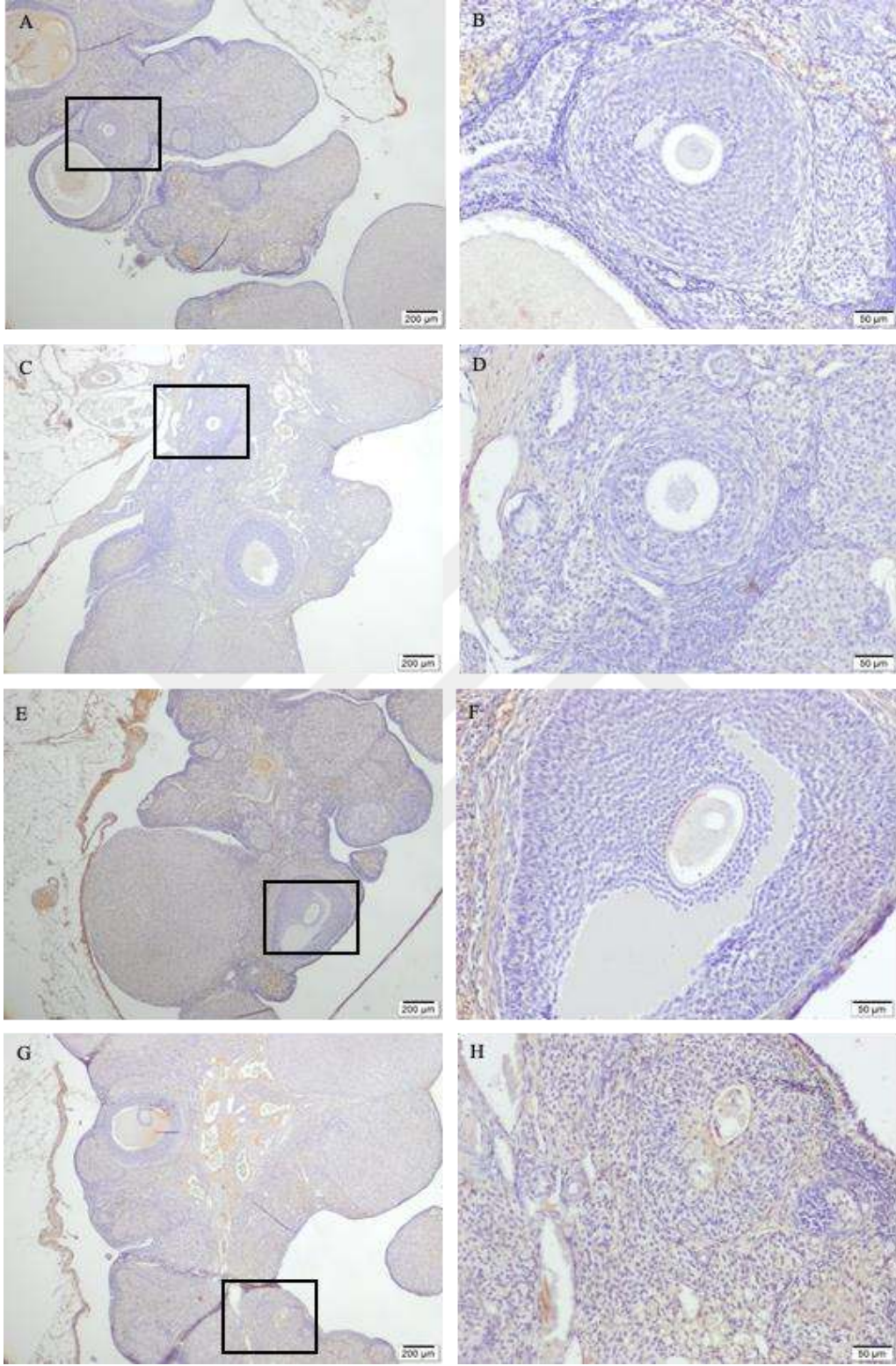
Ortalama AMH düzeyleri Kontrol grubunda $121,8 \pm 14,8$ ng/ml, İzotonik grubunda $117,2 \pm 12,3$ ng/ml, STZ grubunda $100,0 \pm 0,00$ ng/ml, STZ + PRP

grubunda $216,1 \pm 13,1$ ng/ml idi (Tablo 14). STZ verilen grupta Kontrol grubu ve İzotonik grubuna göre istatistiksel anlamlı düşüş tespit edildi ($P=0.017$). STZ+PRP grubundaki AMH düzeylerinde ise STZ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.001$) (Tablo 10).

Sonuç olarak PRP uygulanan grupta AMH düzeyi hem interfoliküler alanda hem de granuloza hücrelerinde artmış olarak saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$) (Şekil 13).

Tablo 10:Ovaryumda AMH Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
AMH (ng/ml)	Kontrol grubu ($121,87 \pm 14,84$)	STZ grubu ($100 \pm 0,0$)	0,017
	STZ grubu ($100 \pm 0,0$)	STZ + PRP grubu ($216,10 \pm 13,11$)	<0,001
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 9:Ovaryum AMH immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H: 50 µm

4.3.2. Ovaryumda PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi

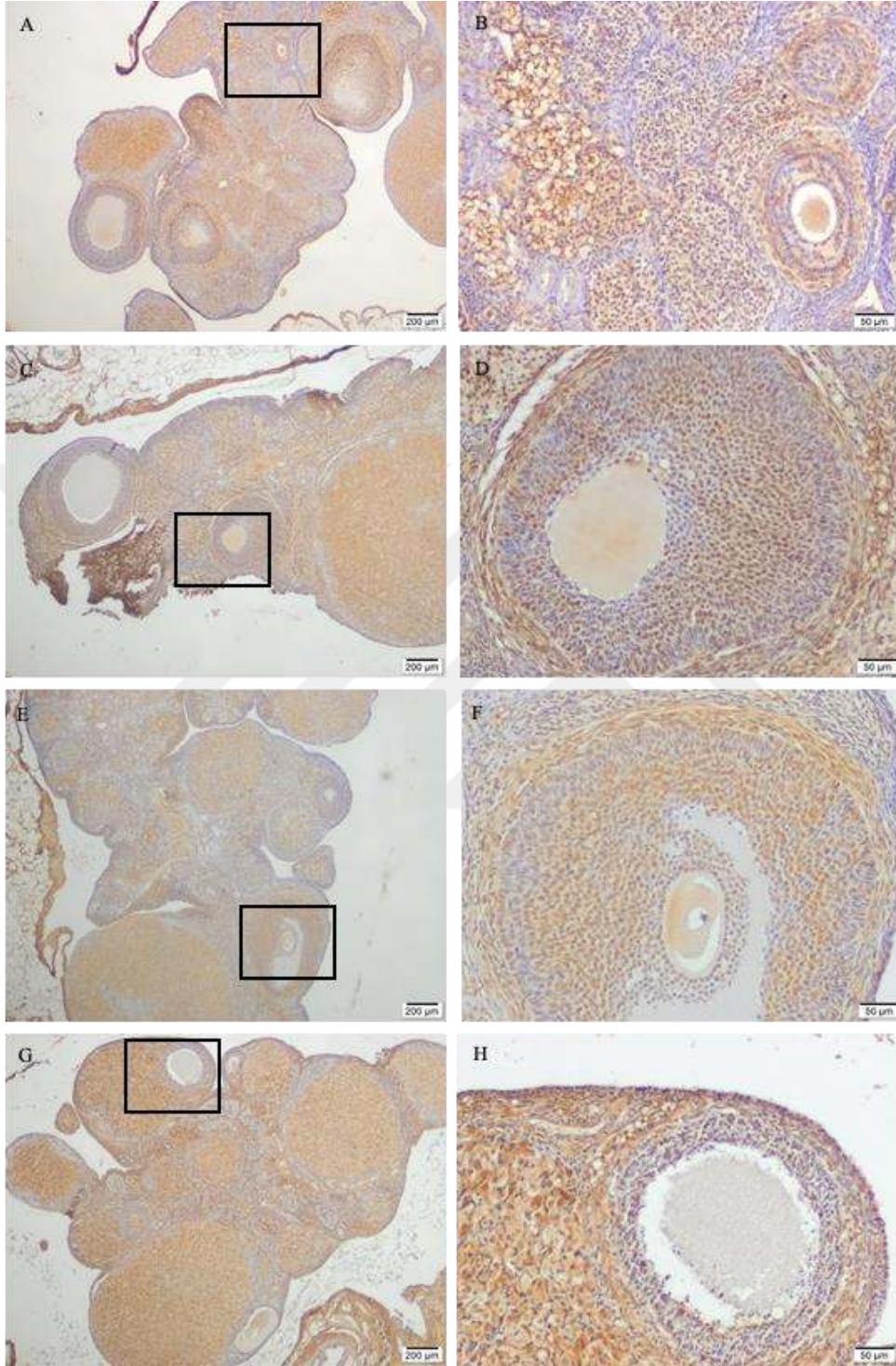
Kontrol grubuna ait doku örneklerinde PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi kuvvetli pozitif (+++) (Şekil 10 A, B) iken İzotonik uygulanan grupta orta şiddette (++) (Şekil 10 C, D, G, H), STZ uygulanan grupta ise hafif şiddette immünreaktivite tespit edildi (Şekil 10 E, F). STZ+PRP uygulanan grupta ise izotonik grubu ile benzer şekilde orta şiddette (++) (Şekil 10 C, D, G, H) immünreaktivite izlendi.

Atretik foliküllerde ve korpus luteumda ise tüm gruplarda PENTRAXİN-3 immünreaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu izlendi (Şekil 10,13).

Ortalama PENTRAXİN-3 düzeyleri Kontrol grubunda $304,83 \pm 9,19$ ng/ml, İzotonik grubunda $278,65 \pm 5,59$ ng/ml, STZ grubunda $239,07 \pm 24,12$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $231,55 \pm 17,12$ ng/ml idi (Tablo 14). Kontrol grubu ile STZ grubu karşılaştırıldığında PENTRAXİN-3 düzeylerinin STZ grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu saptanmıştır ($p < 0,001$). STZ+PRP grubunda PENTRAXİN-3 düzeylerinde, STZ grubu ile karşılaştırıldığında hafif azalma olmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 11).

Tablo 11:Ovaryumda PENTRAXİN-3 Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
PENTRAXIN-3 (ng/ml)	Kontrol grubu ($304,83 \pm 9,19$)	STZ grubu ($239,07 \pm 24,12$)	<0,001
	STZ grubu ($239,07 \pm 24,12$)	STZ + PRP grubu ($231,55 \pm 17,12$)	>0,05
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 10:Ovaryum PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup;
G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H: 50 µm

4.3.3. Ovaryumda TGF- β immünreaktivitesi

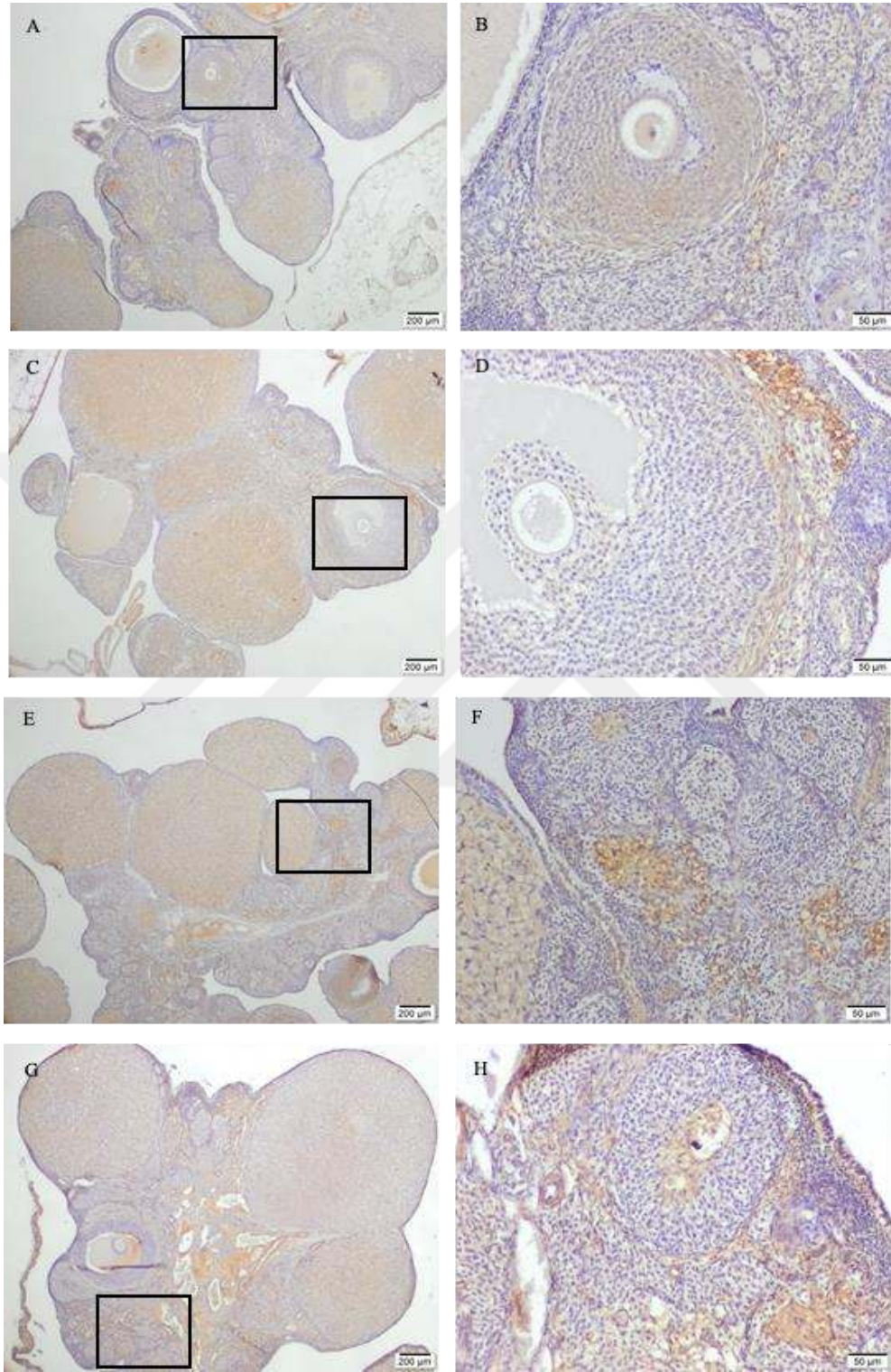
TGF- β immünreaktivitesi tüm gruplardaki granüloza hücrelerinde izlenmekle birlikte gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Kontrol ve İzotonik gruplarına ait ovaryum dokusundaki TGF- β immünreaktivitesinin hafif şiddette (+) olduğu tespit edildi (Şekil 11 A, B, C, D, G, H). STZ uygulanan grupta ise TGF- β immünreaktivitesi orta şiddette idi (++) (Şekil 11 E, F). STZ+PRP grubuna ait ovaryum dokusundaki TGF- β immünreaktivitesinin ise hafif şiddette (+) olduğu tespit edildi (Şekil 11 A, B, C, D, G, H).

Bununla birlikte TGF- β immünreaktivitesinin sıklıkla foliküllerin granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde olduğu izlendi (Şekil 11). Foliküllerin teka eksterna ve korpus luteum bölgelerinde ise immünreaktivitenin daha yoğun ve orta şiddette (++) olduğu görüldü.

Ortalama TGF- β düzeyleri Kontrol grubunda $135,15 \pm 20,26$ ng/ml, İzotonik grubunda $164,87 \pm 18,43$ ng/ml, STZ grubunda $212,36 \pm 33,83$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $156,78 \pm 18,68$ ng/ml idi (Tablo 14). STZ grubunda Kontrol grubuna göre TGF- β düzeylerinde artış saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). STZ+PRP grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında serum TGF- β düzeylerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde azalma saptandı ($p=0.001$) (Tablo 12, Şekil 13).

Tablo 12:Ovaryumda TGF β Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
TGF β (ng/ml)	Kontrol grubu ($135,15 \pm 20,26$)	STZ grubu ($212,36 \pm 33,83$)	<0,001
	STZ grubu ($212,36 \pm 33,83$)	STZ + PRP grubu ($156,78 \pm 18,68$)	0.001
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 11:Ovaryum TGFβ immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 μm, B, D, F, H: 50 μm

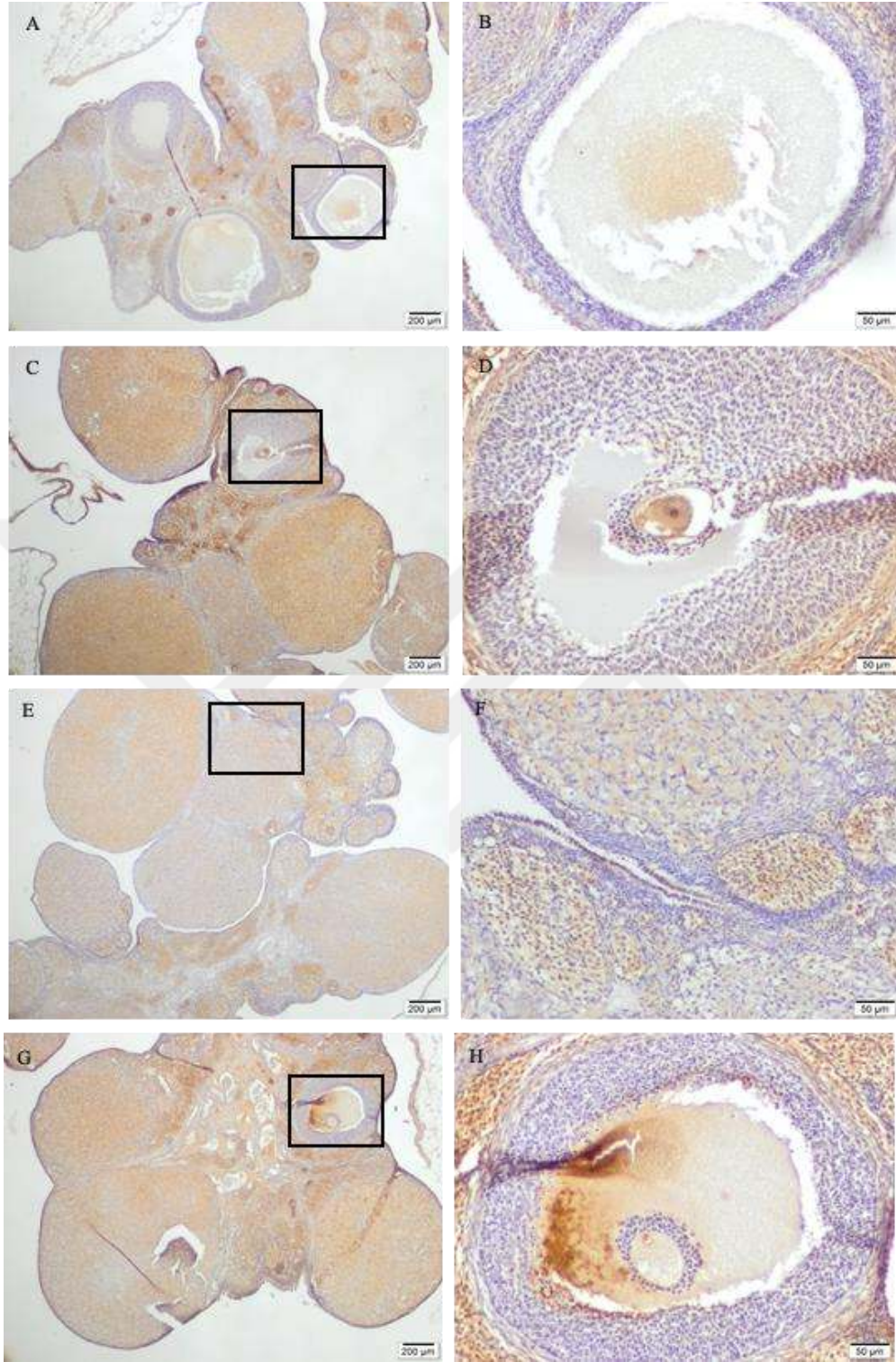
4.3.4. Ovaryumda VEGF immunreaktivitesi

Tüm gruplarda VEGF immunreaktivitesi değerlendirildiğinde, kontrol grubunda VEGF immünreaktivitesi hafif şiddette (+) idi (Şekil 12 A, B). Bunun yanında İzotonik ve STZ uygulanan gruplarda immünreaktivite orta şiddette olup benzerdi (++) (Şekil 12 C, D, E, F). En yüksek immünreaktivitenin STZ+PRP grubunda, kuvvetli şiddette (+++++) olduğu belirlendi (Şekil 12 G, H, Şekil 13).

Ortalama VEGF düzeyleri Kontrol grubunda $158,21 \pm 33,69$ ng/ml, İzotonik grubunda $225,07 \pm 15,15$ ng/ml, STZ grubunda $240,36 \pm 8,89$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $305,47 \pm 5,13$ ng/ml idi (Tablo 14). STZ grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VEGF düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0.001$). STZ + PRP grubu STZ grubu ile karşılaştırıldığında VEGF düzeylerini istatistiksel olarak önemli ölçüde artış saptandı ($p<0.001$) (Tablo 13).

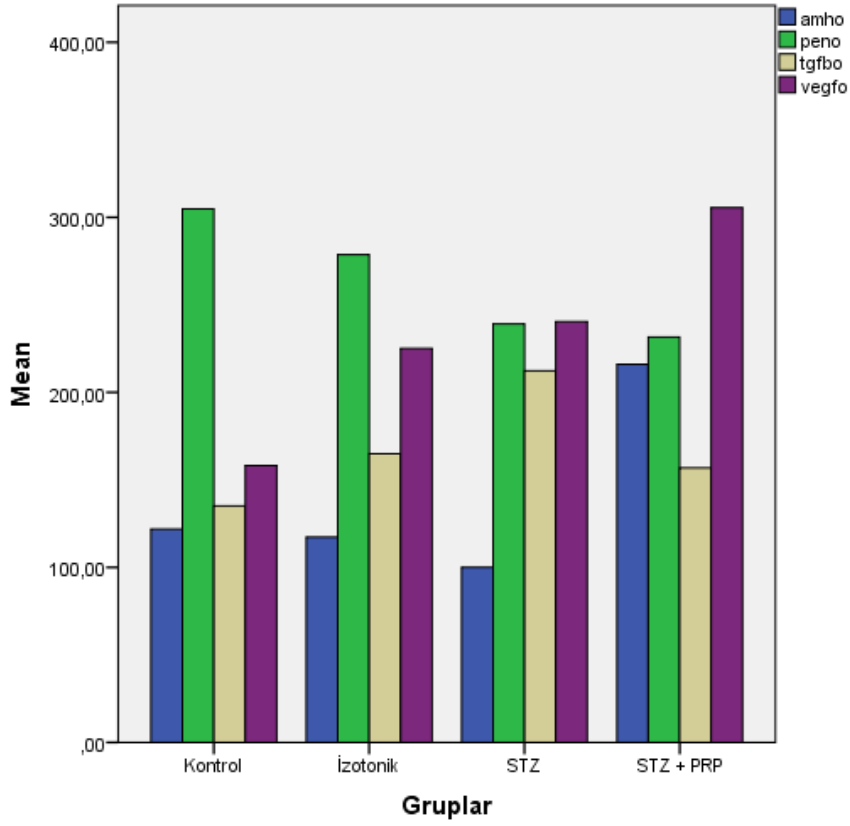
Tablo 13:Ovaryumda VEGF Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
VEGF (ng/ml)	Kontrol grubu (158,21 $\pm$ 33,69)	STZ grubu (240,36 $\pm$ 8,89)	0,001
	STZ grubu (240,36 $\pm$ 8,89)	STZ + PRP grubu (305,47 $\pm$ 5,13)	<0.001
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 12:Ovaryum VEGF immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H: 50 µm



Şekil 13:Ovaryumda AMH, PENTRAXİN-3, VEGF ve TGFβ Düzeylerinin Deney Gruplarına Göre Dağılımı

Tablo 14:Ovaryumda Deney Gruplarında AMH, PENTRAXİN-3, VEGF ve TGFβ Düzeylerinin Dağılımları

	KONTROL	İZOTONİK	STZ	STZ+PRP	P Değeri
AMH (ng/ml)	121,87 ± 14,84	117,23 ± 12,39	100 ± 0,0	216,10 ± 13,11	<0.001
PENTRAXIN-3 (ng/ml)	304,83 ± 9,19	278,65 ± 5,59	239,07 ± 24,12	231,55 ± 17,12	<0.001
TGFβ (ng/ml)	135,15 ± 20,26	164,87 ± 18,43	212,36 ± 33,83	156,78 ± 18,68	<0.001
VEGF (ng/ml)	158,21 ± 33,69	225,07 ± 15,15	240,36 ± 8,89	305,47 ± 5,13	<0.001

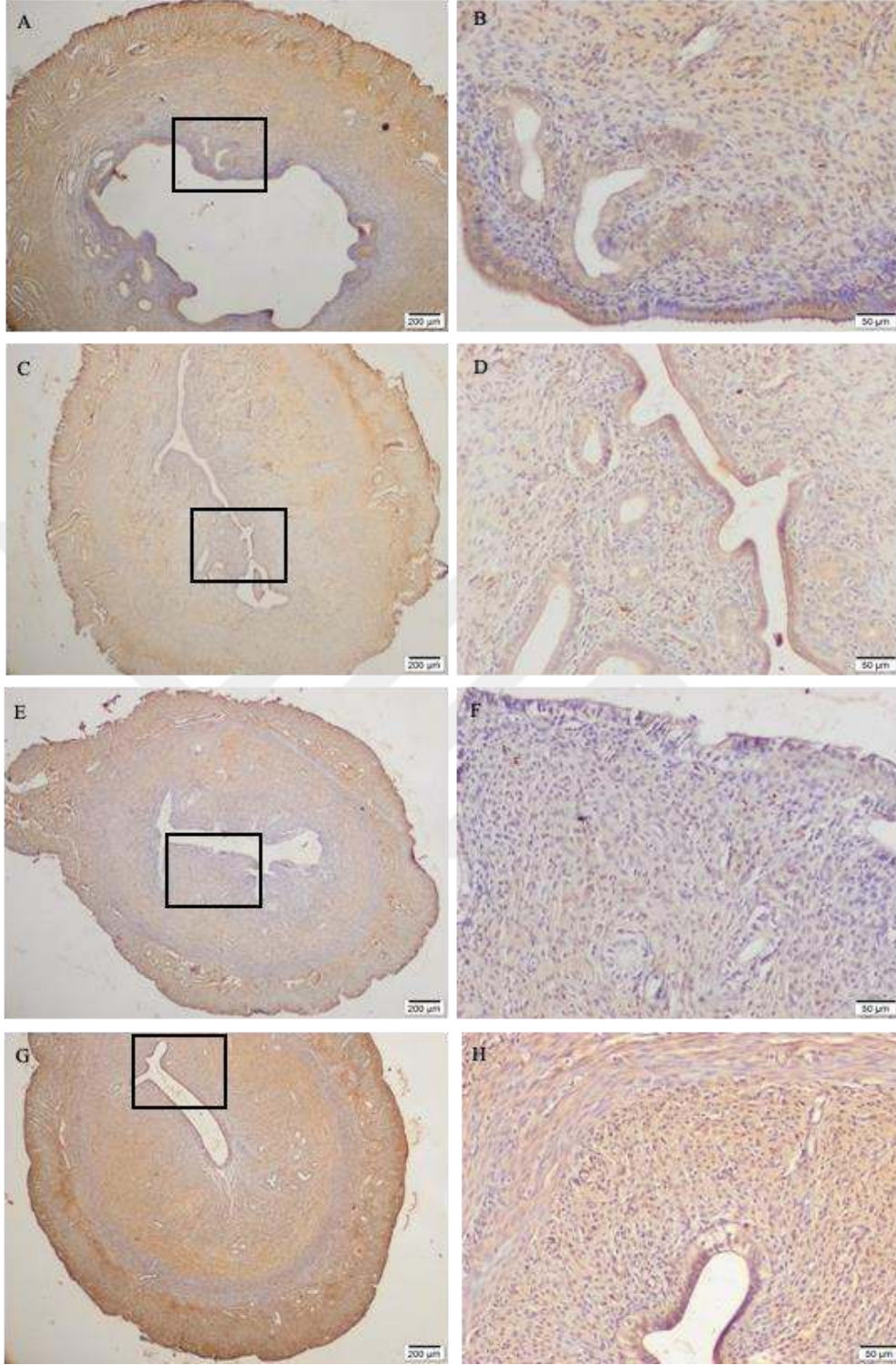
4.3.5 Endometriumda AMH immünreaktivitesi

Tüm gruplarda AMH immünreaktivitesi değerlendirildiğinde, Kontrol ve İzotonik uygulanan gruplarda AMH immünreaktivitesinin orta şiddette (++) ekspresyonu izlendi (Şekil 14 A, B, C, D). En düşük immünreaktivitenin STZ uygulanan grupta ve hafif şiddette (+) olduğu belirlendi (Şekil 18). Bunun yanında STZ+PRP uygulanan grupta ise AMH immünreaktivitesi (+++) tespit edildi. STZ+PRP grubu immünreaktivitenin en yüksek olduğu gruptu (Şekil 14 G, H).

Ortalama AMH düzeyleri Kontrol grubunda $209,17 \pm 8,30$ ng/ml, İzotonik grubunda $209,42 \pm 11,66$ ng/ml, STZ grubunda $167,91 \pm 9,28$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $312,51 \pm 7,79$ ng/ml idi (Tablo 19). STZ grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AMH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış saptandı ($p < 0.001$). STZ + PRP grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında AMH düzeylerinde önemli ölçüde artış saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$) (Tablo 15).

Tablo 15:Endometriumda AMH Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
AMH (ng/ml)	Kontrol grubu ($209,17 \pm 8,30$)	STZ grubu ($167,91 \pm 9,28$)	<0,001
	STZ grubu ($167,91 \pm 9,28$)	STZ + PRP grubu ($312,51 \pm 7,79$)	<0.001
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 14:Endometrium AMH immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H: 50 µm

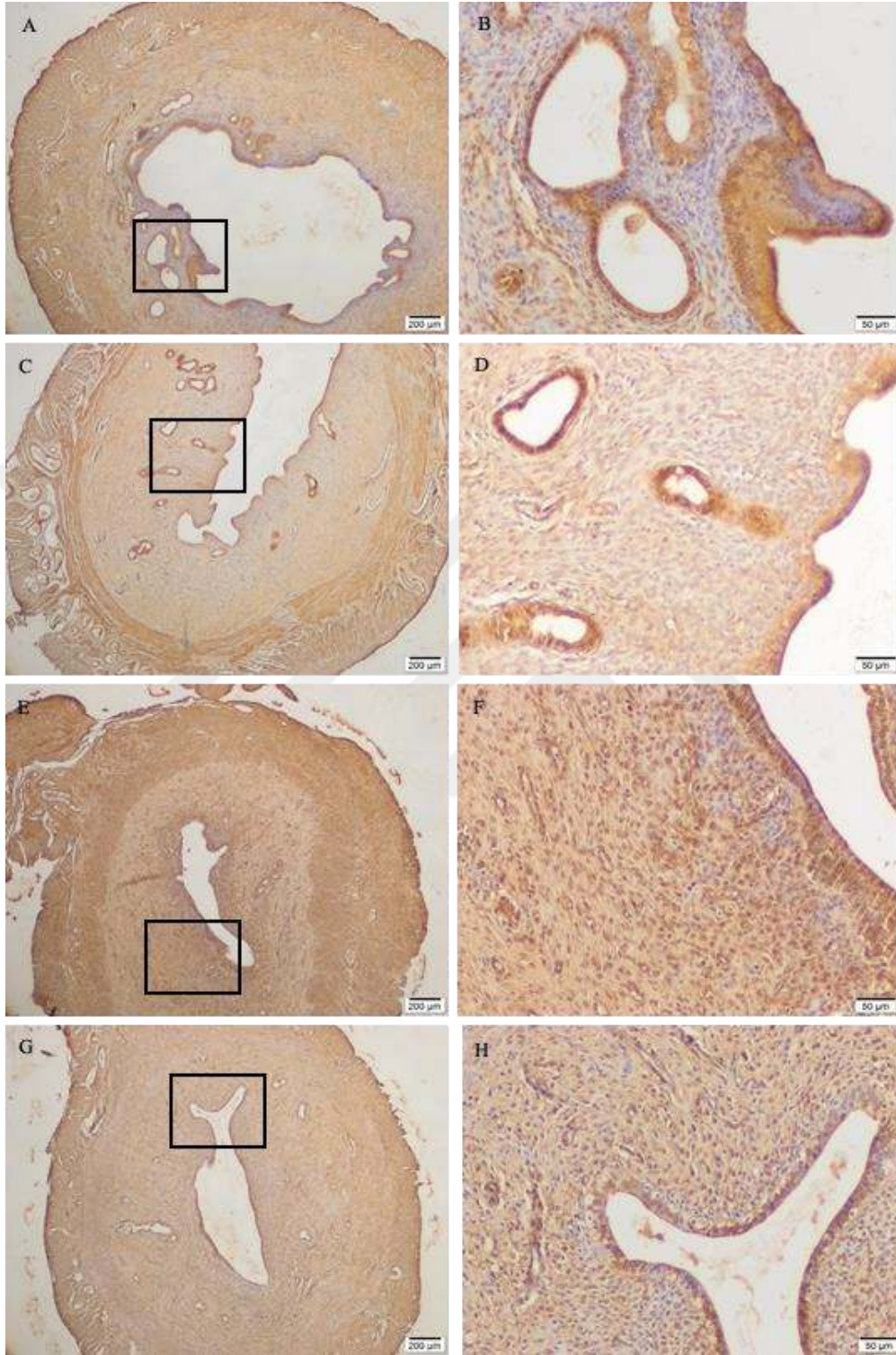
4.3.6. Endometriumda PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi

PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi tüm gruplarda özellikle endometrium tabakasında yer alan prizmatik epitel hücrelerinde ve uterin bezlere ait hücrelerde belirgin olarak izlendi. Bunun yanında gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 18). Kontrol ve İzotonik gruplarına ait endometrium dokusundaki PENTRAXİN-3 immünreaktivitesinin orta şiddette (++) olduğu tespit edildi (Şekil 15 A, B, C, D). STZ uygulanan grupta ise PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi kuvvetli şiddette idi (++) (Şekil 15 E, F). STZ+PRP grubuna ait endometrium dokusundaki PENTRAXİN-3 immünreaktivitesinin ise orta şiddette (++) olduğu tespit edildi (Şekil 15 G, H).

Ortalama PENTRAXİN-3 düzeyleri Kontrol grubunda $216,87 \pm 11,98$ ng/ml, İzotonik grubunda $223,75 \pm 16,19$ ng/ml, STZ grubunda $316,86 \pm 7,44$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $222,48 \pm 24,42$ ng/ml idi (Tablo 19). STZ grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PENTRAXİN-3 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p < 0.001$). STZ + PRP grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında ise PENTRAXİN-3 düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 16).

Tablo 16:Endometriumda PENTRAXİN-3 Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
PENTRAXIN-3 (ng/ml)	Kontrol grubu ($216,87 \pm 11,98$)	STZ grubu ($316,86 \pm 7,44$)	<0,001
	STZ grubu ($316,86 \pm 7,44$)	STZ + PRP grubu ($222,48 \pm 24,42$)	<0.001
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 15:Endometrium PENTRAXİN-3 immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H: 50 µm

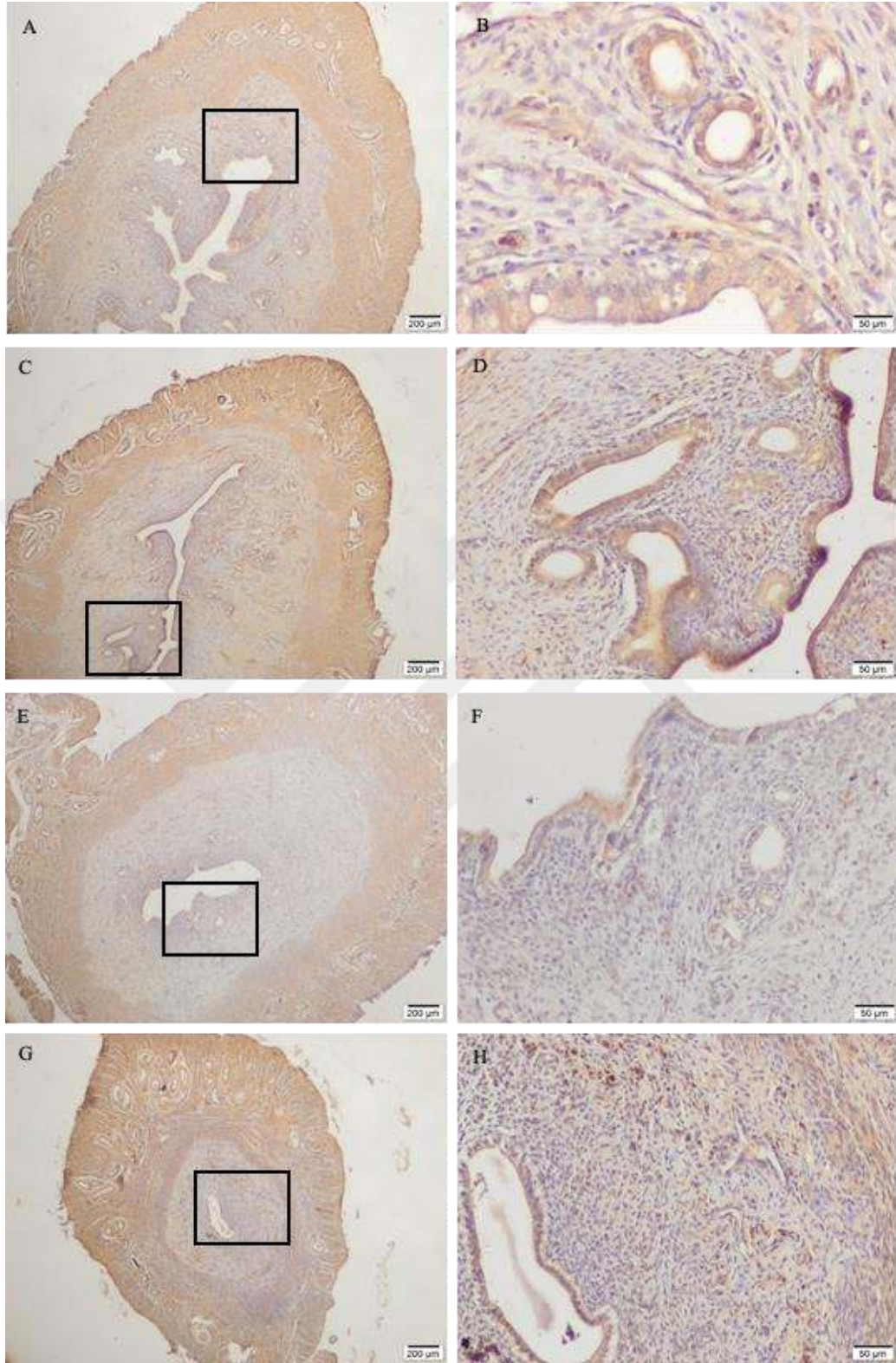
4.3.7. Endometriumda TGF- β immünreaktivitesi

TGF- β immünreaktivitesi Kontrol ve İzotonik gruplarının endometrium dokularında orta şiddette (++) idi (Şekil 16 A, B, C, D, Şekil 18). STZ uygulanan grupta ise TGF- β immünreaktivitesi hafif şiddette (+) tespit edildi (Şekil 16 E, F, Şekil 18). STZ+PRP uygulanan grubun endometrium dokusunda orta şiddette (++) idi (Şekil 16 G, H, Şekil 18).

Ortalama TGF- β düzeyleri Kontrol grubunda $200,12 \pm 29,82$ ng/ml, İzotonik grubunda $205,83 \pm 3,41$ ng/ml, STZ grubunda $166,18 \pm 5,99$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $237,10 \pm 28,55$ ng/ml idi (Tablo 19). STZ grubunda, İzotonik grubuna göre TGF- β düzeylerinde anlamlı azalış saptandı ($p < 0.001$). STZ + PRP grubu, STZ grubu karşılaştırıldığında TGF- β düzeylerinde artış saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.003$) (Tablo 17).

Tablo 17:Endometriumda TGF β Düzeyinin İzotonik, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
TGF β (ng/ml)	İzotonik grubu ($205,83 \pm 3,41$)	STZ grubu ($166,18 \pm 5,99$)	<0,001
	STZ grubu ($166,18 \pm 5,99$)	STZ + PRP grubu ($237,10 \pm 28,55$)	0.003
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 16:Endometrium TGF β immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 μ m, B, D, F, H: 50 μ m

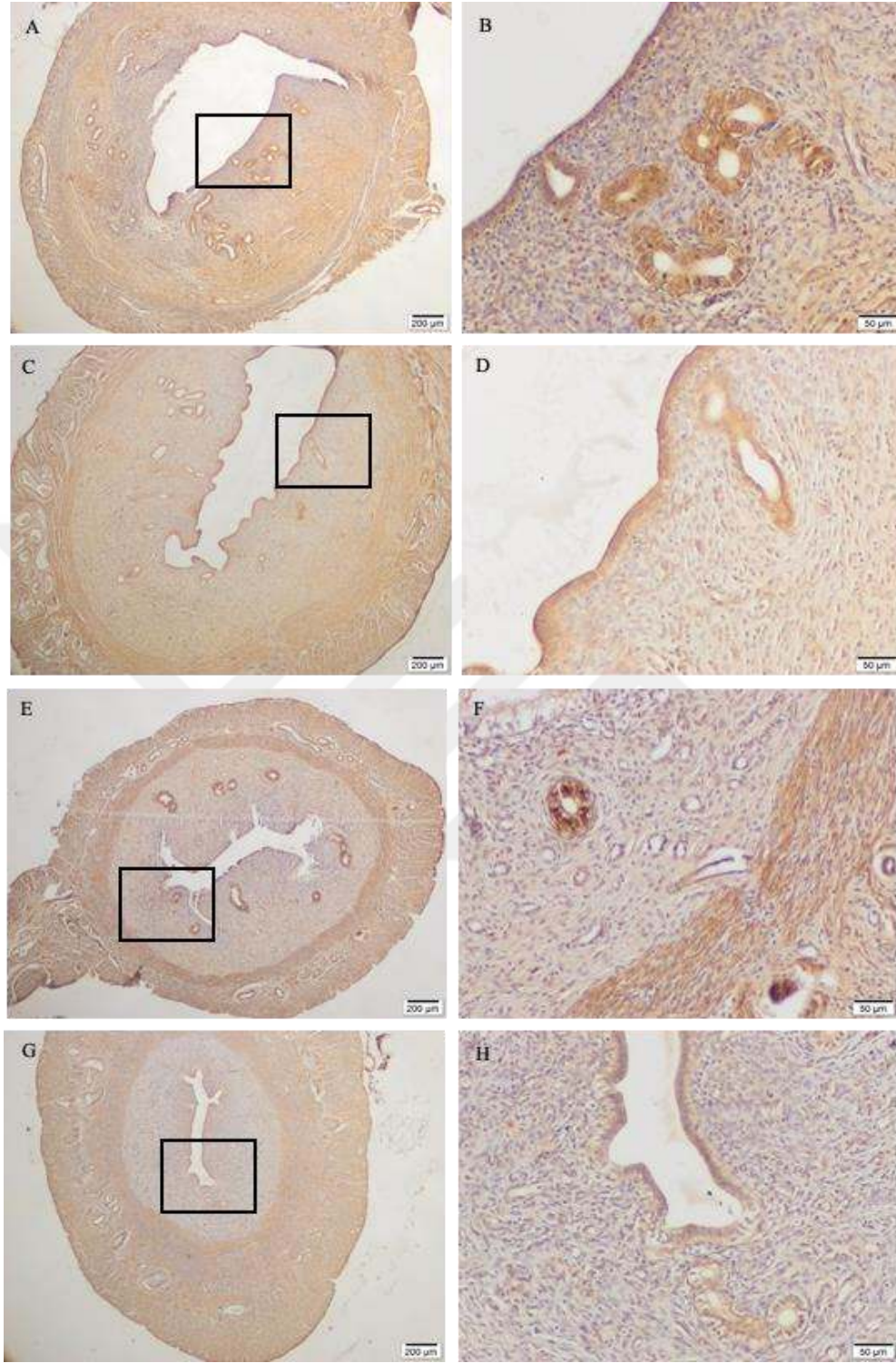
4.3.8. Endometriumda VEGF immünreaktivitesi

VEGF immünreaktivitesi tüm gruplarda belirgin olarak izlendi (Şekil 18). Kontrol grubunda VEGF immünreaktivitesi kuvvetli pozitif (+++) iken, İzotonik grubuna ait endometrium dokusunda orta şiddette (++) olduğu tespit edildi (Şekil 17 A, B, C, D). STZ uygulanan grupta VEGF immünreaktivitesi hafif şiddette idi (++) (Şekil 17 E, F). STZ+PRP uygulanan gruba ait endometrium dokusunda ise immünreaktivitenin orta şiddette (++) olduğu tespit edildi (Şekil 17 G, H).

Ortalama VEGF düzeyleri Kontrol grubunda $303,50 \pm 3,36$ ng/ml, İzotonik grubunda $200,30 \pm 26,78$ ng/ml, STZ grubunda $190,05 \pm 79,72$ ng/ml, STZ + PRP grubunda $214,32 \pm 19,30$ ng/ml idi (Tablo 19). STZ grubunda Kontrol grubuna göre VEGF düzeylerinde azalış saptandı ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). STZ + PRP grubu STZ grubu ile karşılaştırıldığında VEGF düzeylerinin arttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$) (Tablo 18).

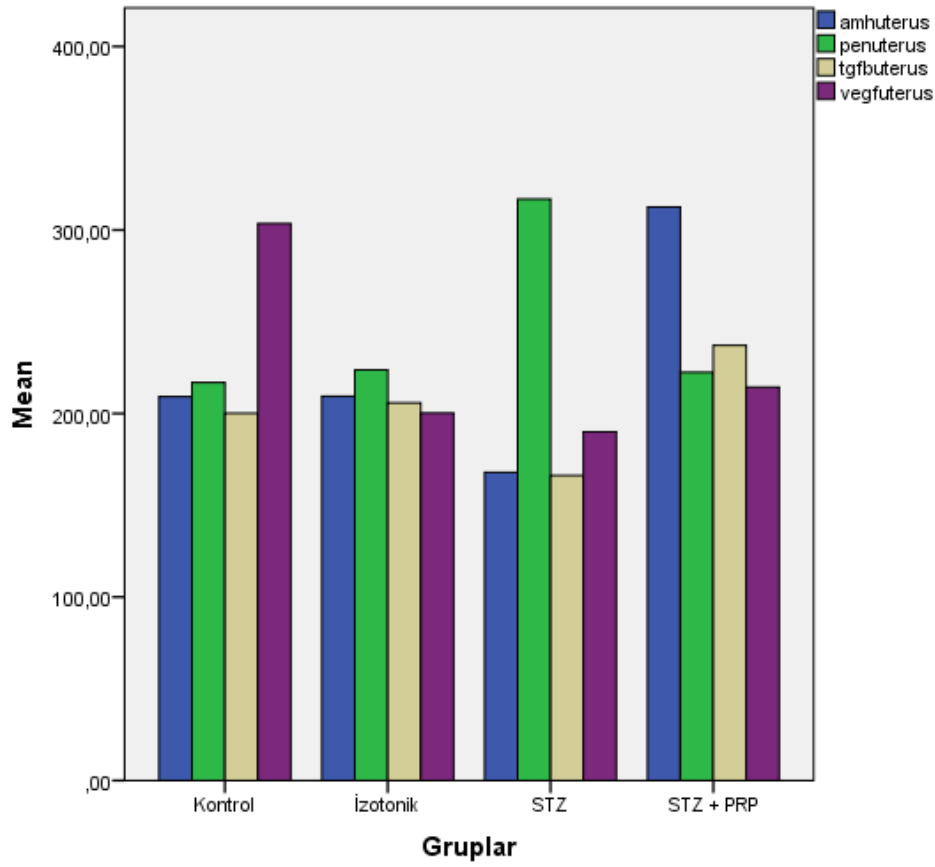
Tablo 18:Endometriumda VEGF Düzeyinin Kontrol, STZ ve STZ+PRP Gruplarında Karşılaştırılması

BAĞIMLI DEĞİŞKEN	KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR		P Değeri
VEGF (ng/ml)	Kontrol grubu ($303,50 \pm 3,36$)	STZ grubu ($190,05 \pm 79,72$)	<0,05
	STZ grubu ($190,05 \pm 79,72$)	STZ + PRP grubu ($214,32 \pm 19,30$)	>0.05
*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.			



Şekil 17:Endometrium VEGF immünreaktivitesi.

A, B: Kontrol grubu; C, D: İzotonik uygulanan grup; E, F: STZ uygulanan grup; G, H: STZ+PRP uygulanan grup. Ölçek: A, C, E, G: 200 µm, B, D, F, H: 50 µm



Şekil 18:Endometriumda AMH, PENTRAXİN-3, VEGF ve TGFβ Düzeylerinin Deney Gruplarına Göre Dağılımı

Tablo 19:Endometriumda Deney Gruplarında AMH, PENTRAXİN-3, VEGF ve TGFβ Düzeylerinin Dağılımları

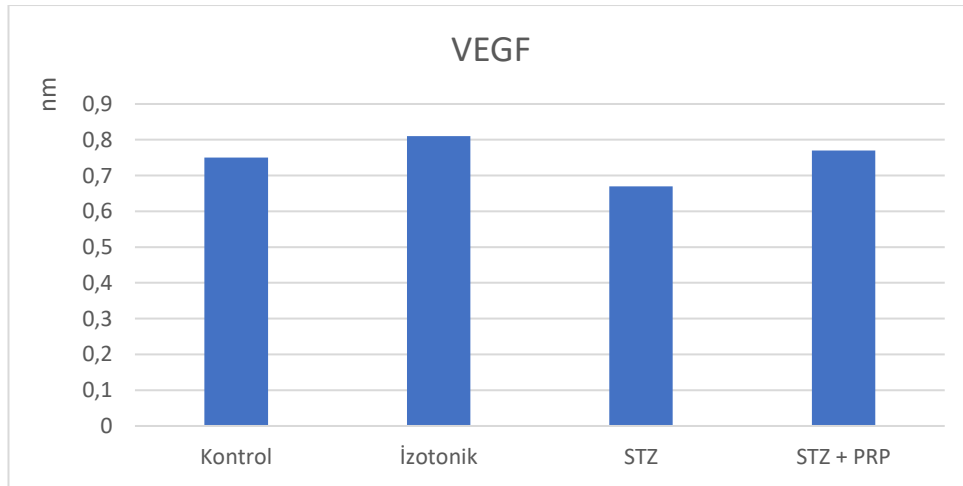
	KONTROL	İZOTONİK	STZ	STZ+PRP	P Değeri
AMH (ng/ml)	209,17 ± 8,30	209,42 ± 11,66	167,91 ± 9,28	312,51 ± 7,79	<0.001
PENTRAXIN-3 (ng/ml)	216,87 ± 11,98	223,75 ± 16,19	316,86 ± 7,44	222,48 ± 24,42	0.001
TGFβ (ng/ml)	200,12 ± 29,82	205,83 ± 3,41	166,18 ± 5,99	237,10 ± 28,55	<0.001
VEGF (ng/ml)	303,50 ± 3,36	200,30 ± 26,78	190,05 ± 79,72	214,32 ± 19,30	0.001

4.4. Biyokimyasal bulgular

4.4.1 Tüm Gruplara ait serum örneklerinde VEGF, Pentraxin-3 ve TGF β Düzeyleri

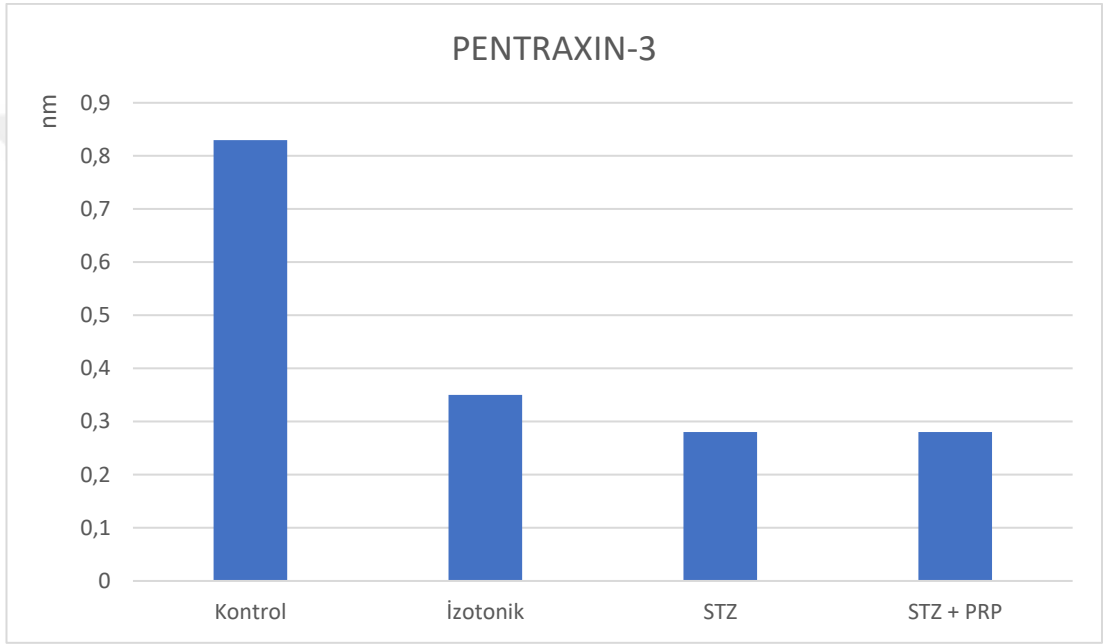
Kontrol, İzotonik, STZ ve STZ+PRP uygulanan gruplara ait sıçanlardan intrakardiyak olarak alınan kan örneklerinden elde edilen kan serumlarında VEGF, PENTRAXIN-3 ve TGF β seviyeleri ELISA testi ile değerlendirildi (Şekil 22).

Ortalama VEGF düzeyleri Kontrol grubunda $0,75 \pm 0,11$ nm, İzotonik grubunda $0,81 \pm 0,13$ nm, STZ grubunda $0,67 \pm 0,06$ nm, STZ + PRP grubunda $0,77 \pm 0,11$ nm olarak tespit edildi. (Tablo 20, Şekil 19). STZ grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum VEGF düzeylerinde azalış saptanmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$). STZ + PRP grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında serum VEGF düzeylerinde anlamlı ölçüde artış olmasına rağmen bu artış da istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p> 0.05$) (Tablo 20).



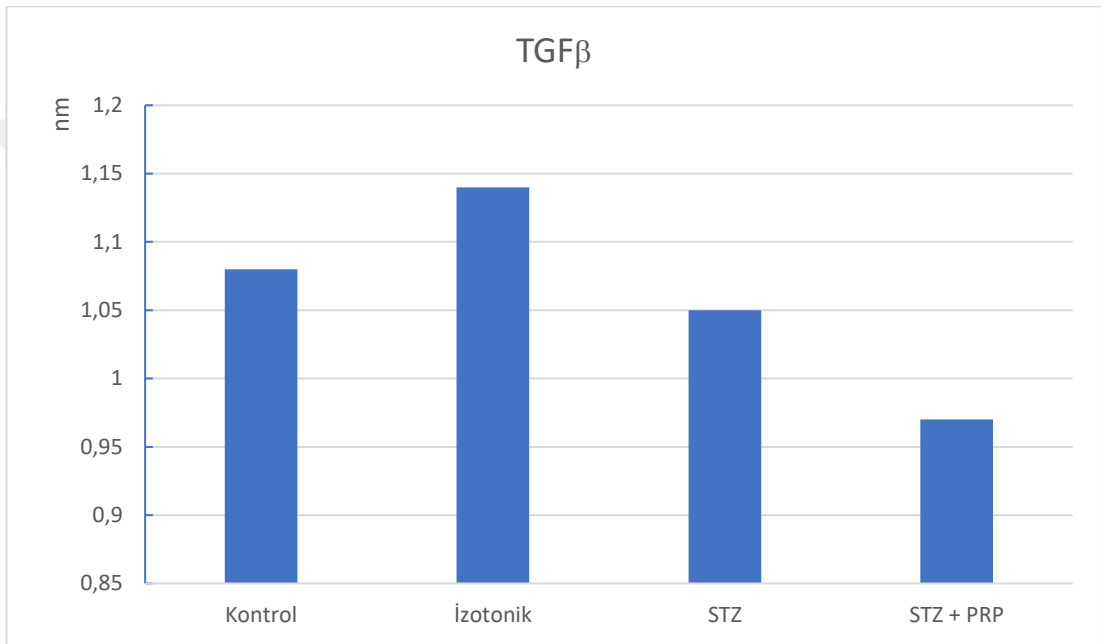
Şekil 19:Tüm Gruplara Ait Serum Örneklerinde VEGF Düzeyleri

Ortalama PENTRAXİN-3 düzeyleri Kontrol grubunda $0,83 \pm 0,03$ nm, İzotonik grubunda $0,35 \pm 0,06$ nm, STZ grubunda $0,28 \pm 0,02$ nm, STZ + PRP grubunda $0,28 \pm 0,06$ nm idi (Tablo 20, Şekil 20). STZ grubunda Kontrol grubuna göre serum PENTRAXİN-3 düzeylerinde azalış olmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.05$). STZ + PRP grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında serum PENTRAXİN-3 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 20).

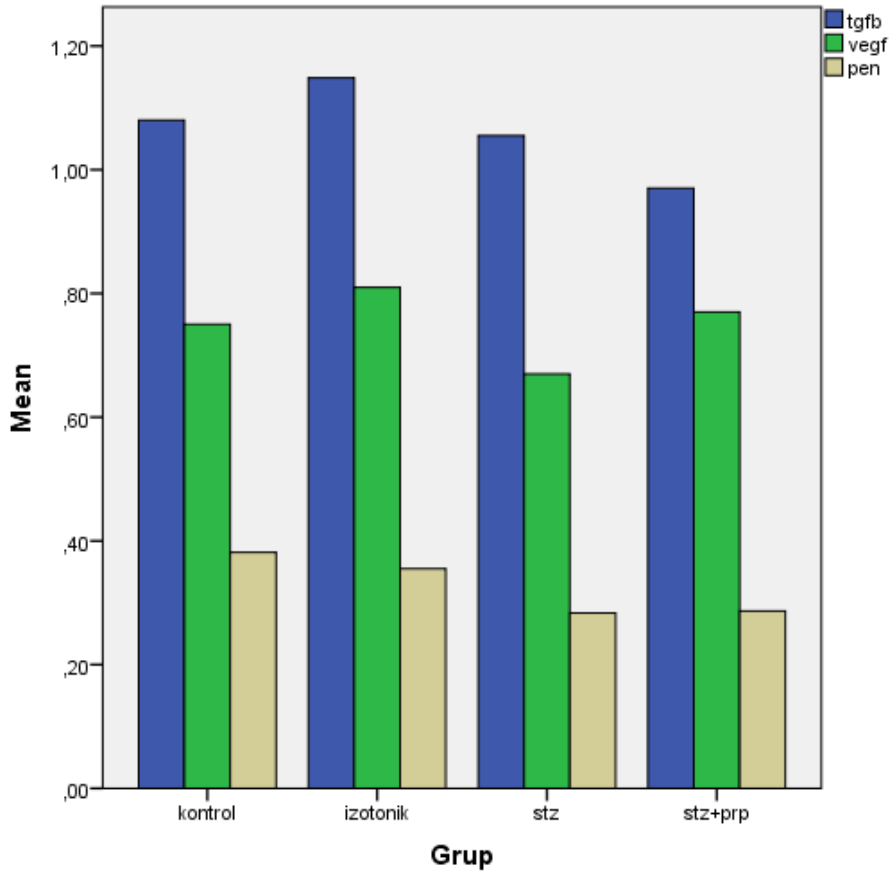


Şekil 20:Tüm Gruplara Ait Serum Örneklerinde PENTRAXİN 3 Düzeyleri

Ortalama TGF β düzeyleri Kontrol grubunda $1.08 \pm 0,07$ nm, İzotonik grubunda $1.14 \pm 0,04$ nm, STZ grubunda $1.05 \pm 0,11$ nm, STZ + PRP grubunda $0,97 \pm 0,12$ nm idi (Tablo 20, Şekil 21). STZ grubunda, Kontrol ve İzotonik gruplarına göre serum TGF β düzeylerinde azalış olmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$). STZ + PRP grubu, İzotonik grubu ile karşılaştırıldığında TGF β serum düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.05$) (Tablo 20).



Şekil 21: Tüm Gruplara Ait Serum Örneklerinde TGF β Düzeyleri



Şekil 22: Biyokimyasal PENTRAXİN-3, VEGF ve TGFβ Düzeylerinin Deney Gruplarına Göre Dağılımı

Tablo 20: Deney Gruplarında Biyokimyasal PENTRAXİN-3, VEGF ve TGFβ Düzeylerinin Dağılımları

	KONTROL	İZOTONİK	STZ	STZ+PRP	P Değeri
PENTRAXIN-3 (nm)	0,83 ± 0,03	0,35 ± 0,06	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,06	<0.05
TGFβ (nm)	1,08 ± 0,07	1,14 ± 0,04	1,05 ± 0,11	0,97 ± 0,12	<0.05
VEGF (nm)	0,75 ± 0,11	0,81 ± 0,13	0,67 ± 0,06	0,77 ± 0,11	>0.05

V. TARTIŞMA

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından bir “pandemi” olarak nitelenen ve sıklığının küresel olarak hala yükselişte olduğu ifade edilen DM, üreme çağındaki kadınları da etkileyerek, uzun dönem ciddi komplikasyonlar ile seyreder. DM dünya çapında kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir (98). Ülkemizde ise Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması (TURDEP-II)’na göre son 12 yılda diyabet sıklığı %90 artarken, bu oranın öngörülenin çok üstünde olduğu belirtilmiştir (15).

Diyabet tanı kriterleri, klinikte sıklıkla başvuru alan ADA ve TEMD kılavuzlarında açıkça belirtilmiştir. Buna göre; rastgele alınan plazma glukoz değerinin 200 mg/dl veya üzerinde olması ve buna diyabet semptomlarının eşlik etmesi, en az 8 saatlik açlığı takiben ölçülen kan şekeri 126 mg/dl veya üzerinde olması, 75 gram glukoz ile yapılan oral glukoz tolerans testi (OGTT)’nin 2. saatinde ölçülen plazma glukozunun 200 mg/dl veya üzerinde olması, HbA1c değerinin %6.5’ten büyük veya eşit olması kriterlerinden en az birinin olması tanı koydurucudur (17).

Diyabetin patofizyolojisinde insülin yetersizliği, β hücre disfonksiyonu, çevresel ve genetik faktörler suçlanmaktadır (7). Dokularda ortaya çıkan oksidatif stres ve oksidatif hasarın diyabete bağlı komplikasyonların oluşmasında etkili bir rolü olduğu belirtilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda diyabete bağlı olarak; uterus ağırlığının azaldığı, luminal ve glandular epitel içinde lipid biriktiği, endometrium ve myometriumun atrofiye uğradığı ve kas hücre tabakası sayısının azaldığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda implantasyon başarısızlığı ve over yetersizliği olduğu düşünülmüştür.

Streptozotosin uygulaması, pankreatik β -hücre hasarına neden olarak deneysel diyabet oluşturulmasında kullanılır. Diyabet olgularında da benzer şekilde serbest oksijen radikallerinin patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir. Hiperglisemi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetiklerken, özellikle mitokondriyal DNA'yı hedefleyerek DNA ve proteinlerle etkileşime girmekte ve hücresel zedelenme oluşturmaktadır (99). Bu yüzden, antioksidan aktivite, STZ ile indüklenen diyabetik ratlarda komplikasyonların gelişimini önleyebilir veya şiddetini azaltabilir (100). Biz de çalışmamızda antioksidan, antifibrotik, antiinflamatuvar etkinliği olan ve hasarlı dokuda iyileşmeye olumlu katkı sağlayan PRP'nin diyabete bağlı komplikasyonlara olan etkisini inceledik.

Çalışmamızda diyabete bağlı over hasarını araştırmak amacıyla over rezerv testlerinden AMH'ı, hem over hem endometriumda sentezlenen, neovaskülarizasyonu gösteren ve glisemik kontrol ile düzeyi değişkenlik gösteren VEGF'i seçtik. Over ve endometriumda hormonal etki ile düzeyi değişen, hücre farklılaşmasında rol oynayan ve profibrotik bir sitokin olan TGFB düzeyinin diyabet ile değişimini inceledik. Bir süper protein ailesi üyesi olan, inflamasyon ve fibrozisi yansıtan bir diğer marker olarak da PTX3'ü inceledik.

Trombositten zengin plazma (PRP) enjeksiyonu maliyet etkin olması, kolay elde edilmesi, kısa sürede uygulanması ve yan etkilerinin göz ardı edilebilir olması nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Genel olarak PRP'nin etki mekanizmaları ve özel olarak overdeki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. Günümüzde PRP uygulanması ile ilgili kadın hastalıkları ve doğum alanındaki çalışmalar kısıtlı olup, çalışmaların birçoğu IVF alanında yapılmıştır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan 98 hasta ile yapılan bir çalışmada embriyo transferinden 48 saat önce intrauterin PRP infüzyonu uygulanmış ve bu çalışma ile klinik gebelik, devam eden gebelik ve implantasyon oranında anlamlı derecede artış saptamışlardır. Trombositten zengin plazma tedavisinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınlar için etkili bir tedavi seçeneği olabileceği gösterilmiştir (101).

Kadın hastalıkları ve doğum alanında PRP uygulaması ilk olarak 2007 yılında Fanning ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Jinekolojik batin operasyonları sonrası ağrı kontrolü amacıyla kullanılmıştır ve çalışma sonucunda ağrı giderilmesinde anlamlı derecede etkili olduğu gözlenmiştir (102). Sonrasında kadın hastalıkları ve doğum kliniklerinde semptomatik tedavi, cinsel işlev bozukluğu ve over fonksiyonlarının iyileştirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (103). Biz de bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş rat modelinde endometrium ve over üzerinde, PRP uygulaması yaparak histolojik, immunhistokimyasal ve biyokimyasal açılardan olası etkileri inceledik.

Diyabetes Mellitus, folikül sayısını ve çapını azaltıp, atretik folikül sayısını artırarak overi etkiler (37). Artan foliküler atrezinin, yumurtalık disfonksiyonuna yol açan foliküler tükenmeyi hızlandırmaktan sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar vardır (104). Dehghani ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada siklofosfamid ile over yetmezliği oluşturulan ratlara intraperitoneal PRP uygulanmış ve pre-antral folikül sayısında artış, antral folikül çapında artış ve oosit çapında artış saptanmıştır (105). Bizim çalışmamızda da STZ ile diyabet oluşturulan grupta atretik folikül sayısının Kontrol ve İzotonik grubuna göre arttığı gözlemlenirken PRP tedavisi sonrası atretik foliküllerin sayısının azaldığı görülmüştür.

Dehghani ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada intraperitoneal uygulanan PRP, over korteks hacminde artış sağlarken over dokusunda neoanjiyogenezin indüklenmesi aracılığı ile over dokusu rejenerasyonunu ve reaktivasyonunu desteklemiştir (105). Bizim çalışmamızda da intraovaryan PRP uygulanması sonrası korteks hacminde artış saptanmıştır.

Literatür, asiste üreme teknolojileri (ART) programlarında klinik gebelik ve canlı doğum oranları ile endometriyal kalınlığın güçlü ilişkisi hakkında çok sayıda kanıt içermektedir. Açıklanamayan infertilitede endometrium hasarı ve implantasyon başarısızlığı suçlanmaktadır. DM gibi metabolik hastalıkların da endometrium hasarında etkili olduğu düşünülmektedir (40). Dişi sıçanlarda PRP'nin intrauterin uygulandığı bir çalışmada, hasarlı endometriumun rejenerasyonunu hızlandırabileceğini ve fibrozisi azaltabileceğini ortaya

koyulmuştur (106). İnce endometriuma sahip infertilite tedavisi için başvuran 115 hastayı kapsayan çalışmada implantasyon penceresinde endometriyal kalınlık 7 mm veya daha az olan hastalar çalışmaya dahil edilmiş ve bu hastalara intrauterin PRP infüzyonu yapıldığında hem gebelik hem canlı doğum oranlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (107). Bizim çalışmamızda da STZ ile diyabet oluşturulan grupta endometrium bütünlüğünün bozulduğu ancak PRP infüzyonu sonrası incelendiğinde epitel bütünlüğünde anlamlı düzelme olduğu saptanmıştır.

PRP'nin içerdiği büyüme faktörlerinin endometrium üzerinde faydalı etkileri olmasına rağmen, PRP'nin düşük konsantrasyonunun (%5) sığır endometriyal hücrelerinin proliferasyonunu artırabileceğini, yüksek konsantrasyonun (%10) ise proliferasyon oranını önlediğini ve olumsuz yan etkilere yol açtığını göstermiştir. Bu nedenle aşırı büyüme faktörünün proliferasyonu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (108). Klinik kullanımlar için onaylanmış bir PRP uygulama dozu, sayısı ve zamanı bulmak ve PRP tedavisini standart ve önerilen bir tedavi stratejisi haline getirmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Over anjiyogenik bir organdır. VEGF etkisi ile granüloza hücrelerinde sentezlenen mRNA tarafından ovaryan angiyogenez kontrol edilir ve folikülogenez düzenlenir (109). Diyabetes Mellitus tanılı hastalarda yapılan bir çalışmada mikrovasküler hasarda VEGF düzeylerinin önemli olduğu gösterilmiştir (88). IVF tedavisi gören hastalarda yapılan bir çalışmada ovaryan yanıt, embriyo kalitesi ve VEGF konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (110). PRP'nin içerdiği faktörlerin over dokusunda neoanjiyogenezi tetiklemesi ve doku rejenerasyonu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (88). Biz de yaptığımız çalışmada STZ grubunda VEGF düzeyinde artış olduğunu saptadık ($p=0.001$). STZ + PRP grubunda ise STZ grubuna göre VEGF düzeyinin artışının ve damar gelişiminin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu saptadık ($p<0.001$)

İnflamatuar bir süreç sonunda endometrium hasarı oluşan hastalarla yapılan bir klinik çalışmada anti-inflamatuar etkili resveratrol kullanılmış ve endometriumda VEGF düzeyinin yanı sıra inflamasyonun da azaldığı

gösterilmiştir (111). Bizim çalışmamızda endometrium VEGF varlığı açısından incelendiğinde ise STZ grubunda Kontrol grubuna göre düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0.05$). PRP uygulamasından sonra STZ + PRP grubunda endometrium dokusunda fibrozis ve inflamasyon azalırken, damarsal gelişimin arttığı görülmüştür. PRP uygulaması sonrasında endometrial VEGF düzeyinin sözü edilen çalışmadakine benzer şekilde arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Diyabetik hastalarda yapılan bir çalışmada hiperglisemi ile serum VEGF düzeylerinde azalış saptanmıştır (88). Biyokimyasal olarak VEGF düzeylerini incelediğimizde; STZ ile hiperglisemi oluşturulan grupta VEGF'in en düşük seviyelerde eksprese edilirken diğer gruplarda benzer oranlarda olduğu görülmüştür. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. ($p>0.05$). STZ+ PRP grubu, STZ grubu ile karşılaştırıldığında serum VEGF düzeyleri anlamlı ölçüde artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p> 0.05$).

AMH foliküllerin granüloza hücrelerinden salgılanan gonadal bir hormondur (68). Yaşla beraber değişmekle birlikte over rezervini gösterdiği düşünülmektedir (73). Düşük serum AMH düzeyleri kötü over yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (76). Diyabet kontrolü ve komplikasyonları ile ilişkili bir çalışmada over rezerv testleri incelenmiş olup, diyabetik kadınlarda diyabetik olmayanlara göre AMH düzeyi daha düşük saptanmıştır (74). Düşük over rezervi ve IVF tedavi başarısızlığı olan hastalarla yapılan bir çalışmada intraovaryan PRP infüzyonu sonrası AMH düzeyinde artış saptanmıştır (112). Bizim çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan grupta AMH düzeyi overde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış saptandı ($p=0.017$). İntraovaryan PRP uygulanan grup diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ise AMH düzeyi hem interfoliküler alanda hem de granuloza hücrelerinde artmış saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

Diyabetes Mellitus endometriumun yapısında ve işlevinde önemli değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (113). Endometriumda AMH düzeyini araştırdığımızda en düşük immünreaktivitenin STZ grubunda olduğu görüldü ($p<0.001$). İntraendometrial PRP infüzyonu yapıldıktan sonra STZ + PRP

grubunda AMH düzeyinin istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı arttığını gözlemledik ($p<0.001$).

TGF- β , hücre çoğalması ve farklılaşmasını, yara iyileşmesini, anjiyogenezi ve bağışıklığı düzenlemede çeşitli rollere sahip bir sitokindir (89). Daha önce yapılan çalışmalarda TGF- β 'nın kollajen oluşumu ve fibrozise yol açtığı saptanmış olup hiperglisemi de bu durumu tetiklemektedir (39). Biz de çalışmamızda STZ grubunda hipergliseminin overde fibrozis yaptığını vurgulamaktayız ($p <0.001$). Doku yaralanmasını iyileştiren intraovaryan PRP tedavisi sonrası TGF- β seviyeleri anlamlı derecede azaldı ($p=0.001$).

Biyokimyasal olarak TGF- β ekspresyonunu incelediğimizde Kontrol, İzotonik ve STZ grubu ratlarda benzer seviyelerde izlenirken ($p>0.05$), PRP sonrası bakılan grupta, overdekine benzer şekilde en düşük seviyede izlendi. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.05$).

Diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada TGF- β düzeyinin artarak endometrial fibrozisi artırdığı saptanmıştır (39). STZ grubunda endometriumu TGF- β düzeyleri açısından incelediğimizde, bu çalışmanın aksine bizim çalışmamızda TGF- β düzeyinin azaldığını saptadık ($p <0.001$). Yine bu çalışmanın aksine PRP tedavisi sonrası TGF- β düzeyinin arttığını gözlemledik ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p= 0.003$) (39). Bu sonuçlar bizim kurduğumuz hipotez ve ön gördüğümüz sonuçlardan farklı idi. Overde ve serum düzeylerinde hipotezimizle uyumlu olarak diyabet grubunda TGF- β düzeyinin arttığını, PRP grubunda azaldığını saptamış olmamıza rağmen endometrial dokudaki sonuçlar daha farklı çıktı. Bu durum deneysel ortamda diyabet oluşturma biçimimiz, PRP uygulama şekli ve dozumuzdan kaynaklı olabilir. Bununla ilgili daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Şiddetli hipergliseminin PTX3 seviyesini artırdığını gösteren bir çalışmada hiperglisemi tedavisinin bu oranı azalttığı saptanmıştır (39). Bizim çalışmamızda overde PTX3 seviyesi, STZ grubunda Kontrol ve İzotonik grubuna göre daha düşük saptandı ($p<0,001$). Ancak bazı çalışmaların aksine

STZ + PRP grubuna baktığımızda PTX3 düzeyi azalmakla birlikte bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (39)

PTX3 doğurganlıkta önemli olmakla birlikte fibroziste de rol oynar. Son çalışmalar endotel disfonksiyonu yaptığını da göstermiştir (114). Bu çalışmada endometrium incelendiğinde, PTX3 immünreaktivitesinin STZ grubunda kuvvetli şiddette pozitif olduğu görüldü ($p<0.001$). STZ + PRP grubunda ise bu düzey neredeyse kontrol grubu ile aynı seviyedeydi ($p<0.001$). Hipergliseminin uterusu PTX3 seviyelerini artırarak fibrozise neden olduğunu göstermekle birlikte PRP tedavisinin bu oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığını gösterdik.

Biyokimyasal olarak PTX3 düzeyini araştırdığımızda; STZ grubunda serum PTX3 seviyesini anlamlı olarak düşük bulurken, Kontrol ve İzotonik gurubunda bu oran yüksekti ($p<0.05$). PRP tedavisi sonrası bakılan STZ + PRP grubunda ise PTX3 ekspresyonu oldukça düşük olmakla birlikte STZ grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

PRP tedavisi ucuz, güvenli ve kolay uygulanabilirdir (57). PRP'nin yara iyileşmesinde, kas-iskelet hastalıklarında, diş hekimliğinde ve yardımcı üreme teknikleri dahil diğer tıbbi alanlarda artan kullanımına rağmen, klinik kullanım için PRP hazırlama yöntemlerinin standardizasyon ihtiyacı açıktır. İyi sonuçlar elde edebilmek için, uygulanmak istenen bölgeye ve amaca yönelik optimal dozu bulmak gerekmektedir. Ayrıca, klinik çalışmalardan elde edilen veriler sınırlıdır. Bu nedenle, nasıl ve hangi klinik durumlarda uygulanması gerektiğini daha iyi anlamak için PRP etki şekli hakkındaki bilgimizi geliştirmek için iyi tasarlanmış randomize çalışmalara ve hücresel düzeyde temel araştırmalara ihtiyaç vardır.

Her çalışmanın olduğu gibi, araştırmamızın da çeşitli kısıtlılıkları mevcuttur. Bu kısıtlılıkların bilinmesi, bulgularımızın doğru şekilde yorumlanabilmesi açısından önem taşımaktadır.

Yaptığımız çalışmanın kısıtlılıklarına bakacak olursak örneklem sayısının küçük olması ve deney hayvanlarının histopatolojik inceleme yöntemi olarak tercih edilen skrolama sisteminin subjektif olması sayılabilir. Etik kaygılardan dolayı, deney hayvanı sayısını fazla arttırmak istemedik. PRP uygulamasının

hazırlanması, uygulama sayısı, uygulama süresi, uygulama dozu ve PRP uygulanmasının sonrasında değerlendirmenin yapılacağı zaman açısından net bir görüşün olmaması kısıtlılıklar arasında gösterilebilir. PRP uygulanması sonrasında elde edilen sonuçların değerlendirildiği ve karşılaştırıldığı çalışmalar yeterli sayıda değildir.

Çalışmamızdaki bir diğer kısıtlılık ise yalnızca tek seans PRP uygulamamızdır. Tekrarlayan dozların dokulardaki iyileşme artış miktarı ve iyileşmenin devamlılığının sağlanmasındaki etkileri bilinmemektedir. Aynı şekilde PRP uygulanması sonrasında ne zaman etkinin azalacağı ile ilgili uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç vardır.



VI. SONUÇ

Tip 2 Diyabetes Mellitus, dünya genelinde görülme sıklığı her geçen yıl daha da artan, ciddi mortalite ve morbiditeye neden olabilen komplikasyonlara sahip kronik, multisistemik bir hastalıktır.

PRP tedavisi, uzun zamandır medikal estetik, plastik rekonstrüktif ve estetik cerrahi, ortopedi gibi branşlarda da olmak üzere çeşitli tıbbi birimlerce, doku ve organ hasarlarının tedavisinde, onarıma yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadır. PRP uygulaması, son yıllarda deneysel ve klinik olarak IVF tedavilerinde; endometriumu uygun kalınlığa getirmek, azalmış over rezervini iyileştirmek ve over kalitesini arttırmak için de kullanılmaktadır.

PRP büyüme faktörleri açısından da zengindir. PRP endometriyal reseptivite ve over fonksiyonu üzerinde olumlu etkilere sahiptir.

Literatür incelendiğinde benzer sonuçların olduğu, destekleyici çalışmalar göz önüne alındığında, intrauterin PRP infüzyonu özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı öyküsü olan hastalarda endometriyal kalınlaşmayı sağlamada güvenli, ucuz bir adjuvan tedavidir. İntraovaryan PRP enjeksiyonunun klinik uygulamasına ilişkin kanıtlar çok yenidir ve henüz yeterince açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu sebepten dolayı, bu konu daha büyük örneklem boyutları ile daha fazla çalışılmalıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, intraovaryan PRP uygulaması over gençleştirmede yeni bir tedavi metodu olmaya aday olabilir.

Çalışmamızda histolojik olarak incelediğimiz preparatlarda deneysel diyabet oluşturulan grupta artmış atretik folliküllerin olması, diyabetin over üzerindeki olumsuz etkide rolü olduğunu düşündürmektedir.

Deneysel rat modelimizde, diyabetin etkileri açısından değerlendirilmiş olup gruplar histolojik, immunhistokimyasal ve biyokimyasal olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda intraovaryan PRP infüzyonunun atretik folikül

sayısını azalttığı, AMH ve VEGF seviyesini yüksek derecede anlamlı olarak arttırarak over rezervini olumlu etkilediğini saptadık. TGF- β seviyesini de anlamlı derecede azaltarak fibrozisi azalttığını gözlemledik. PTX3 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptadık.

Biyokimyasal olarak incelediğimizde VEGF seviyesini diyabetik grupta en düşük saptarken PRP tedavisi, tedavi edilmeyen grupla karşılaştırıldığında serum VEGF düzeylerini anlamlı ölçüde arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Histopatolojik bulgularla uyumlu olarak serum TGF- β seviyesi de PRP verilen grupta en düşük düzeyde saptandı ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıydı. Serum PTX3 seviyelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

İntrauterin uygulanan PRP'nin de endometrium epitel bütünlüğünü sağladığını gözlemledik. Endometriumda AMH seviyelerinin anlamlı olarak yüksek saptanması doğurganlık üzerinde olumlu etkiler göstermesini düşündürmektedir. PRP tedavisinin, tedavi edilmeyen grupla karşılaştırıldığında VEGF seviyelerini arttırmasına rağmen bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Diyabetik grupta PTX3 seviyeleri anlamlı derecede artarken PRP tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış saptandı. TGF-Betayı incelediğimizde PRP tedavisi verilen grupta diyabetik gruba göre yüksek saptandı. TGF β düzeyinin endometriumdaki etkisi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bulguların diyabetik hastaların üreme sağlığında umut vadeditici olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki bulgulara göre, diyabetin over rezervini, folikül kalitesini azalttığını ve fibrozisi arttırdığını; endometrial fibrozise neden olarak endometrium epitel bütünlüğünü bozduğunu saptadık. PRP tedavisi sonrası ise endometrial epitel bütünlüğünün sağlandığı, atretik folikül sayısının azaldığı, neovaskülarizasyonun arttığı saptandı. Bu bulgular diyabetik kadınlarda hem diyabetin hem de PRP uygulamasının, üreme sağlığı ve kadın doğurganlığı hakkında önemli sonuçlar sunmaktadır.

VII.ÖZET

DIYABETİK RAT MODELİNDE PRP’NİN OVER VE ENDOMETRİUM ÜZERİNE ETKİSİ

AMAÇ: Bu çalışmada Diyabetes Mellitus’un mikrovasküler hasar ve fibrozis yapıcı etkisi AMH, VEGF, TGF β , Pentraxin-3 üzerinden incelenerek, PRP tedavisinin over ve endometrium üzerindeki tedavi edici ve koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamızda sıçanlar üzerinde STZ aracılığı ile deneysel diyabet modeli oluşturuldu. Diyabetin fibrozis yapıcı etkisi belirli markerlar aracılığı ile histopatolojik yöntemlerle, histokimyasal boyamalarla ve biyokimyasal olarak incelendi. PRP tedavisin etkisi endometrium, ovaryum ve kan örnekleri üzerinden incelendi. Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak değerlendirildi.

BULGULAR: Diyabetin overde atretik folikülleri indüklediği, over rezervini azalttığı, endometriumda fibrozisi arttırıp epitel bütünlüğünü bozduğu ve angiogenezi azalttığı saptandı. PRP tedavisi verilen grupta AMH seviyesi hem intrauterin hem intraovaryan olarak diğer gruplara göre anlamlı artarken, VEGF seviyesi artmasına rağmen anlamlı farklılık saptanmadı. Tedavi verilen grupta TGF β seviyeleri intraovaryan ve biyokimyasal olarak azalmasına rağmen endometrial olarak artmış saptandı. PTX3 seviyesi ise intrauterin azalmasına rağmen biyokimyasal ve intraovaryan olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

SONUÇ: Diyabetik ratlarda PRP tedavisi sonrası over rezervinin, endometrial bütünlüğün arttığı görülürken fibrozisin azaldığı saptandı. PRP kadın doğum kliniğinde klasik tedavilere destek olarak umut vadeci olabilir.

ANAHTAR KELİMELEER: PRP, Diyabetes Mellitus, TGFbeta, AMH, VEGF, PENTRAXİN-3

VIII. ABSTRACT

THE EFFECT OF PRP ON OVARY AND ENDOMETRIUM IN DIABETIC RAT MODEL

OBJECTIVE: In this study, it was aimed to investigate the therapeutic and protective effects of PRP treatment on the ovary and endometrium by examining the microvascular damage and fibrosis-forming effect of diabetes mellitus on AMH, VEGF, TGF β , Pentraxin-3.

MATERIALS AND METHODS: In our study, an experimental diabetes model was created on rats by means of STZ. The fibrosis effect of diabetes was examined by histopathological methods, histochemical staining and biochemically by means of certain markers. The effect of PRP treatment was examined on endometrium, ovary and blood samples.

The difference between the obtained findings and the groups was evaluated statistically.

RESULTS: It was determined that diabetes induces atretic follicles in the ovary, decreases ovarian reserve, increases fibrosis in the endometrium, disrupts epithelial integrity, and decreases angiogenesis. AMH levels increased significantly in the PRP group compared to the other groups, both intrauterine and intraovarian, although VEGF levels increased, significant difference was not found. Despite the fact that, TGF levels decreased biochemically and intraovarian in the treated group, no endometrial increase was detected. Although PTX3 level decreased in utero, no significant difference was found in terms of biochemical and intraovarian.

CONCLUSION: It was found that ovarian reserve and endometrial thickness increased after PRP treatment, while fibrosis decreased. PRP may be promising as a supplement to conventional treatments in the obstetrics clinic.

KEYWORDS: PRP, Diabetes Mellitus, TGF β , AMH, VEGF, PENTRAXIN-3

IX. KAYNAKLAR

1. Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. 2020;
2. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. TEMD. In: TEMD Diyabet Kılavuzu. 2016.
3. BAKAN G. DİYABET VE SOSYO-KÜLTÜREL YAKLAŞIM. Kesit Akademi. 2017;12(12).
4. Sodeman's Pathologic Physiology. Mechanisms of Disease. Pathophysiology. Ann Intern Med. 1980;93(3).
5. Lakhtakia R. The history of diabetes mellitus. Vol. 13, Sultan Qaboos University Medical Journal. 2013.
6. YALOW RS, BERSON SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J Clin Invest. 1960;39.
7. Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. Vol. 43, Endocrine. 2013.
8. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segrè A V., Steinthorsdottir V, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. Nat Genet. 2012;44(9).
9. Dunning BE, Gerich JE. The role of α -cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. Vol. 28, Endocrine Reviews. 2007.

10. Orbay E. Diyabetin komplikasyonları. *Türkiye Klinikleri Nutrition and Dietetics - Special Topics*. 2017;3(3).
11. Rughani A, Friedman JE, Tryggstad JB. Type 2 Diabetes in Youth: the Role of Early Life Exposures. Vol. 20, *Current Diabetes Reports*. 2020.
12. Ekmektzoglou KA, Zografos GC. A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. Vol. 12, *World Journal of Gastroenterology*. 2006.
13. Lin X, Xu Y, Pan X, Xu J, Ding Y, Sun X, et al. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep*. 2020;10(1).
14. Boulton PA, Magliano PD, Boyko PE. IDF Diabetes Atlas 2021 – 10th edition. *Journal of Diabetes Research*. 2021.
15. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(2).
16. Onat A, Can G, Yüksel H, Ademoğlu E, Erginler-Ünaltuna N, Kaya A, et al. TEKHARF 2017: Tıp Dünyasının Kronik Hastalıklara Yaklaşımına Öncülük. *Tekharf 2017*. 2017.
17. Goyal A, Gupta Y, Singla R, Kalra S, Tandon N. American Diabetes Association “Standards of Medical Care—2020 for Gestational Diabetes Mellitus”: A Critical Appraisal. Vol. 11, *Diabetes Therapy*. 2020.
18. Karsidag K, Satman I, Dinccag N, Aksoyek S, Imamoglu S, Yilmaz T, et al. A case report with autoimmune Type 1 diabetes mellitus and chronic idiopathic trombositopenic purpura. *Istanbul Tıp Fak Mecmuasi*. 1994;57(4).
19. Powers A. Diabetes mellitus: management and therapies. In: *Harrison’s Principles of Internal Medicine*, 19e. 2015.

20. Otten EJ. Cecil textbook of medicine, 22nd edition. J Emerg Med. 2005;28(1).
21. Kahn R. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 1997;20(7).
22. Pedersen ML. Diabetes care in the dispersed population of Greenland. A new model based on continued monitoring, analysis and adjustment of initiatives taken. Vol. 78, International Journal of Circumpolar Health. 2019.
23. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. The Lancet. 2009;373(9677).
24. Volkova NI, Davidenko IY, Degtyareva YS. Gestational diabetes mellitus. Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation). 2021;2021(9).
25. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Revista Española de Cardiología (English Edition). 2020;73(5).
26. ADA. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care. 2019;42.
27. Loveman E, Frampton GK, Clegg AJ. The clinical effectiveness of diabetes education models for type 2 diabetes: A systematic review. Health Technol Assess (Rockv). 2008;12(8).
28. Chasan-Taber L, Marcus BH, Stanek E, Ciccolo JT, Marquez DX, Solomon CG, et al. A randomized controlled trial of prenatal physical activity to prevent gestational diabetes: Design and methods. J Womens Health. 2009;18(6).

29. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: Update regarding thiazolidinediones: A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the study of diabetes. Vol. 31, Diabetes Care. 2008.
30. Salman S, Özdemir D, Pekkolay Z, Satman İ, Adas M, Aktürk M. Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. TEMD Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. 2022;15.
31. COMBA B, MİS L, COMBA A, ÇINAR A, TAŞ A. Deneysel Olarak Diabet Oluşturulmuş Ratlarda Yara İyileşmesinde Sildenafil Sitratın Bazı Hematolojik Parametrelere ve Mineral Maddelere Etkisi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi. 2014;9(3).
32. Özdedeli K, Aktuğ H, Oltulu F, Öktem G, Yavaşoğlu A, Açıkgöz E, et al. Deneysel diabet modeli oluşturulan farelerde tirozin kinaz inhibitör uygulamanın testis dokusu üzerine olan etkilerinin pluripotensi kapasitesi ve hücre adezyonu özelinde araştırılması. Ege Tıp Dergisi. 2017;56(2).
33. de Freitas Moreira M, do Vale Canabrava N, Lira SM, Oliveira TR, da Silva JYG, Holanda MO, et al. Experimental model of type 2 diabetes induced by fat diet consumption and low dose of streptozotocin in C57BL/6J mice. Diabetol Metab Syndr. 2015;7(S1).
34. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Vol. 50, Physiological Research. 2001.
35. Lenzen S, Tiedge M, Jörns A, Munday R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: Lessons from Animal Diabetes VI. 1996.
36. Nandi A, Poretsky L. Diabetes and the Female Reproductive System. Vol. 42, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2013.

37. Ali EMT, Abdallah HI, El-Sayed SM. Histomorphological, VEGF and TGF- β immunoexpression changes in the diabetic rats' ovary and the potential amelioration following treatment with metformin and insulin. *J Mol Histol.* 2020;51(3).
38. Zhou F, Shi LB, Zhang SY. Ovarian fibrosis: A phenomenon of concern. Vol. 130, *Chinese Medical Journal.* 2017.
39. Artunc-Ulkumen B, Pala HG, Pala EE, Yavasoglu A, Yigitturk G, Erbas O. Exenatide improves ovarian and endometrial injury and preserves ovarian reserve in streptozocin induced diabetic rats. *Gynecological Endocrinology.* 2015;31(3).
40. Seaward AVC, Burke SD, Croy BA. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. *Human Reproduction.* 2010;25(11).
41. Boubekri A, Gernigon-Spychalowicz T, Khammar F, Exbrayat JM. Histological and immunohistological aspects of the ovarian cycle of the algerian wild sand rat, *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828. In: *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2007.
42. Jones HW, Rock JA. Te Linde's operative gynecology: Eleventh edition. *Te Linde's Operative Gynecology: Eleventh Edition.* 2015.
43. Hayiroğlu AE, Karaca T, Demirtaş S. Streptozotocin-Induced Diabetic that Histochemical and Immunohistochemical Examination of Mast Cells Distribution in Ovary and Uterus During Different Stages of Estrous Cycle in Rats. *Kafkas Journal of Medical Sciences.* 2016;6(1).
44. ŞAHİN ERSOY G, EKEN M, ÖZTEKİN D, ÇÖĞENDEZ E, EROĞLU M. Ulusal jinekoloji ve obstetrik kongresi'nde üreme endokrinolojisi ve infertilite alanında sunulan bildirilerin uluslararası yayına dönüştürülme oranları. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni.* 2015;0(0).
45. Mescher AL. Junqueira ' s Basic Histology Text & Atlas. Mc Graw Hill. 2017;(January).

46. Kim JH, Park M, Paek JY, Lee WS, Song H, Lyu SW. Intrauterine Infusion of Human Platelet-Rich Plasma Improves Endometrial Regeneration and Pregnancy Outcomes in a Murine Model of Asherman's Syndrome. *Front Physiol.* 2020;11.
47. Weaker FJ, Herbert DC. Netter's Essential Histology by William K. Ovalle and Patrick C. Nahirney . *Clinical Anatomy.* 2009;22(3).
48. Mathers LH. Clinical Anatomy for Medical Students. *Ann Plast Surg.* 1987;18(4).
49. Ganong WF. Tıbbi fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevi. 2002.
50. Berkovich N. Science against Injustice: A Literary Investigation of Vladimir Bogoraz's Silhouettes from Gornal'. *East Eur Jew Aff.* 2021;51(1).
51. de Miguel-Gómez L, López-Martínez S, Campo H, Francés-Herrero E, Faus A, Díaz A, et al. Comparison of different sources of platelet-rich plasma as treatment option for infertility-causing endometrial pathologies. *Fertil Steril.* 2021;115(2).
52. Hoda SA, Hoda RS. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. *Adv Anat Pathol.* 2004;11(6).
53. Dornhorst AC. Book Review: Review of Medical Physiology. *Proc R Soc Med.* 1966;59(5).
54. Digre A, Lindskog C. The Human Protein Atlas—Spatial localization of the human proteome in health and disease. *Protein Science.* 2021;30(1).
55. Marx R. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? : Implant Dentistry. *Implant Dent.* 2001;10(4).
56. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2008;1(3–4).

57. Ahmadian S, Sheshpari S, Pazhang M, Bedate AM, Beheshti R, Abbasi MM, et al. Intra-ovarian injection of platelet-rich plasma into ovarian tissue promoted rejuvenation in the rat model of premature ovarian insufficiency and restored ovulation rate via angiogenesis modulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020;18(1).
58. Zaki SM, Algaleel WA, Imam RA, Abdelmoaty MM. Mesenchymal stem cells pretreated with platelet-rich plasma modulate doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(7).
59. Sundman EA, Cole BJ, Karas V, della Valle C, Tetreault MW, Mohammed HO, et al. The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis. *American Journal of Sports Medicine*. 2014;42(1).
60. Bolton L. Platelet-Rich Plasma: Optimal Use in Surgical Wounds. Vol. 33, *Wounds*. 2021.
61. Eftekhari M, Neghab N, Naghshineh E, Khani P. Can autologous platelet rich plasma expand endometrial thickness and improve pregnancy rate during frozen-thawed embryo transfer cycle? A randomized clinical trial. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018;57(6).
62. Hajipour H, Nejabati HR, Latifi Z, Hamdi K, Bahrami-asl Z, Fattahi A, et al. Lymphocytes immunotherapy for preserving pregnancy: Mechanisms and Challenges. Vol. 80, *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018.
63. Zadehmodarres S, Salehpour S, Saharkhiz N, Nazari L. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: A pilot study. *J Bras Reprod Assist*. 2017;21(1).
64. Hajipour H, Farzadi L, Latifi Z, Keyhanvar N, Navali N, Fattahi A, et al. An update on platelet-rich plasma (PRP) therapy in endometrium and ovary related infertilities: clinical and molecular aspects. Vol. 67, *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2021.

65. Su K, Bai Y, Wang J, Zhang H, Liu H, Ma S. Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2018;37(5).
66. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2005;16(6).
67. Lv PP, Jin M, Rao JP, Chen J, Wang LQ, Huang CC, et al. Role of anti-Müllerian hormone and testosterone in follicular growth: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2020;20(1).
68. Mohammad MB, Seghinsara AM. Polycystic ovary syndrome (PCOS), diagnostic criteria, and AMH. Vol. 18, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017.
69. Silva MSB, Giacobini P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. Vol. 78, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021.
70. Zec I, Tislaric-Medenjak D, Bukovec Megla Z, Kucak I. Anti-Müllerian hormone: A unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;
71. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: The role of anti-Müllerian hormone. Vol. 124, *Reproduction*. 2002.
72. Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: Ovarian reserve testing and its potential clinical implications. Vol. 20, *Human Reproduction Update*. 2014.
73. De Vet A, Laven JSE, De Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: A putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002;77(2).
74. Kim C, Dunn RL, Braffett B, Cleary PA, Arends V, Steffes M, et al. Ovarian reserve in women with Type 1 diabetes in the Diabetes Control

and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. Vol. 33, Diabetic Medicine. 2016.

75. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3).
76. Ecochard R, Boehringer H, Rabilloud M, Marret H. Chronological aspects of ultrasonic, hormonal, and other indirect indices of ovulation. *Br J Obstet Gynaecol*. 2001;108(8).
77. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril*. 2000;73(4).
78. la Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, MacKlon NS. Anti-Müllerian hormone (AMH): What do we still need to know? Vol. 24, *Human Reproduction*. 2009.
79. Dindar B. Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün (VEGF) Ratlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. 2015.
80. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Vol. 9, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005.
81. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998;28(1).
82. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Vol. 60, *Cancer Research*. 2000.
83. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. Vol. 580, *FEBS Letters*. 2006.

84. Guimerà M, Morales-Ruiz M, Jiménez W, Balasch J. LH/HCG stimulation of VEGF and adrenomedullin production by follicular fluid macrophages and luteinized granulosa cells. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(6).
85. Sugino N. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction*. 2002;123(3).
86. Matsui N, Kawano Y, Nakamura S, Miyakawa I. Changes in vascular endothelial growth factor production associated with decidualization by human endometrial stromal cells in vitro. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004;83(2).
87. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: Examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. In: *Biochemical Pharmacology*. 2004.
88. Peczyńska J, Urban M, Urban B, Glowinska B. [Evaluation of the vascular endothelial growth factor in children and adolescents with type 1 diabetes]. *Pol Merkur Lekarski*. 2004;16(95).
89. Ghafoory S, Varshney R, Robison T, Kouzbari K, Woolington S, Murphy B, et al. Platelet TGF- β 1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury. *Blood Adv*. 2018;2(5).
90. Omwandho COA, Konrad L, Halis G, Oehmke F, Tinneberg HR. Role of TGF-s in normal human endometrium and endometriosis. Vol. 25, *Human Reproduction*. 2010.
91. Kristensen SG, Andersen K, Clement CA, Franks S, Hardy K, Andersen CY. Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(4).

92. Goteri G, Altobelli E, Tossetta G, Zizzi A, Avellini C, Licini C, et al. High temperature requirement A1, transforming growth factor beta 1, phosphoSmad2 and Ki67 in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *European Journal of Histochemistry*. 2015;59(4).
93. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, Krejsek J. Pentraxin 3(PTX 3): An endogenous modulator of the inflammatory response. Vol. 2012, *Mediators of Inflammation*. 2012.
94. Erbas O, Pala HG, Pala EE, Oltulu F, Aktug H, Yavasoglu A, et al. Ovarian failure in diabetic rat model: Nuclear factor-kappaB, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014;53(4).
95. May L, Kuningas M, van Bodegom D, Meij HJ, Frolich M, Slagboom PE, et al. Genetic variation in pentraxin (PTX) 3 gene associates with PTX3 production and fertility in women. *Biol Reprod*. 2010;82(2).
96. Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril*. 2005;83(4 SUPPL.).
97. Tang R, Wang S, Yang J, Wu T, Fei J. Application of platelet-rich plasma in traumatic bone infections. Vol. 19, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021.
98. Gautam P, Dwivedi S. A CROSS SECTIONAL STUDY TO DETERMINE PREVALENCE OF TYPE 2 DM IN ASSOCIATION WITH IDRS & RANDOM BLOOD GLUCOSE IN WOMEN OF GWALIOR CITY. *J Evol Med Dent Sci*. 2017;6(17).
99. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Vol. 107, *Circulation Research*. 2010.
100. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2000;42(4).

101. Zamaniyan M, Peyvandi S, Heidaryan Gorji H, Moradi S, Jamal J, Yahya Poor Aghmashhadi F, et al. Effect of platelet-rich plasma on pregnancy outcomes in infertile women with recurrent implantation failure: a randomized controlled trial. *Gynecological Endocrinology*. 2021;37(2).
102. Fanning J, Murrain L, Flora R, Hutchings T, Johnson JM, Fenton BW. Phase I/II prospective trial of autologous platelet tissue graft in gynecologic surgery. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007;14(5).
103. White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*. 2012;18(3).
104. Zhou J, Peng X, Mei S. Autophagy in ovarian follicular development and Atresia. Vol. 15, *International Journal of Biological Sciences*. 2019.
105. Dehghani F, Aboutalebi H, Esmaeilpour T, Panjehshahin MR, Bordbar H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on ovarian structures in cyclophosphamide-induced ovarian failure in female rats: a stereological study. *Toxicol Mech Methods*. 2018;28(9).
106. Jang HY, Myoung SM, Choe JM, Kim T, Cheon YP, Kim YM, et al. Effects of autologous platelet-rich plasma on regeneration of damaged endometrium in female rats. *Yonsei Med J*. 2017;58(6).
107. Efendieva Z, Vishnyakova P, Apolikhina I, Artemova D, Butov K, Kalinina E, et al. Hysteroscopic injections of autologous endometrial cells and platelet-rich plasma in patients with thin endometrium: a pilot randomized study. *Sci Rep*. 2023;13(1).
108. Marini MG, Perrini C, Esposti P, Corradetti B, Bizzaro D, Riccaboni P, et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2016;14(1).

109. Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. Vol. 138, Reproduction. 2009.
110. Gao MZ, Zhao XM, Lin Y, Sun ZG, Zhang HQ. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF- β 1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. J Assist Reprod Genet. 2012;29(10).
111. Khodarahmian M, Amidi F, Moini A, Kashani L, Salahi E, Danaii-mehrabad S, et al. A randomized exploratory trial to assess the effects of resveratrol on VEGF and TNF- α 2 expression in endometriosis women. J Reprod Immunol. 2021;143.
112. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nitsos N, Lazaros L, Rapani A, Pantou A, et al. Successful Implantation and Live Birth Following Autologous Platelet-rich Plasma Treatment for a Patient with Recurrent Implantation Failure and Chronic Endometritis. In Vivo (Brooklyn). 2019;33(2).
113. Garris DR. Diabetes (db/db) mutation-induced endometrial epithelial lipoapoptosis: Ultrastructural and cytochemical analysis of reproductive tract atrophy. Reproductive Biology and Endocrinology. 2005;3.
114. Yasunaga T, Ikeda S, Koga S, Nakata T, Yoshida T, Masuda N, et al. Plasma pentraxin 3 is a more potent predictor of endothelial dysfunction than high-sensitive C-reactive protein. Int Heart J. 2014;55(2).

