

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Atorvastatin'in Diyabetik Sıçan Ovaryumları Üzerinde Biyokimyasal ve
Histolojik Etkilerinin İncelenmesi**

Liridona ADİLİ OSMANİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak hazırlanmıştır

KOCAELİ

2018

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Atorvastatin'in Diyabetik Sıçan Ovaryumları Üzerinde Biyokimyasal ve
Histolojik Etkilerinin İncelenmesi**

Liridona ADİLİ OSMANİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz

**Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve
Tübitak (1002- Hızlı Destek Programı)Tarafından Desteklenmiştir**

KOÜ BAP Proje Numarası: 2016/079

TÜBİTAK Proje Numarası: 216S346

Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ HADYEK 7/12-2015

KOCAELİ

2018

KABUL VE ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Atorvastatin'in diyabetik sıçan ovaryumları üzerinde biyokimyasal ve histolojik etkilerinin incelenmesi

Tez Yazarı: Liridona ADİLİ OSMANİ

Tez Savunma Tarihi: 30 Mayıs 2018

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
DANIŞMAN	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ	
ÜYE (BAŞKAN)	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN	
ÜYE	Prof. Dr. Meryem ÇAM	
ÜYE	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR	
ÜYE	Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH	
ÜYE	Dr. Öğretim Üyesi Gülçin GACAR	

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

30 / 05 / 2018

Prof. Dr. Sema AŞKIN KEÇELİ

Enstitü Müdürü



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2015 /34 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Atorvastatin'in diyabetik sıçan ovaryumları üzerinde histolojik ve biyokimyasal etkilerinin incelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI KURUMU	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ/KOÜ Tıp Fak Histoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Dokt. Öğr. İridona Adili OSMANİ, Doç. Dr. Yusufhan YAZIR, Yard. Doç. Dr. Fatma Cyla ERALDEMİR, Prof. Dr. Feriha ERCAN

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLU ve EKLERİ	x
------------------------------	--------------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır. KARAR NO: KOÜ HADYEK 7/12-2015 KARAR TARİHİ: 09.07.2015	
------------------------	--	--

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOÜ) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOÜ Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOÜ Deney Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOÜ Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOÜ Deney Hayvanları Araştırma Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Demeği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

ÖZET

Atorvastatin'in Diyabetik Sıçan Ovaryumları Üzerinde Biyokimyasal ve Histolojik Etkilerinin İncelenmesi

Amaç. Deneysel diyabet modeli (DM) oluşturduğumuz sıçanların ovaryumlarında oluşan hasarı incelemek ve Atorvastatin tedavisinin doku koruyucu etkilerini değerlendirmektir.

Yöntem. STZ ile diyabetik hale getirdiğimiz Wistar albino sıçanlara Atorvastatin içeren bir ilaç 21 gün süre 2 farklı dozda (10 ve 20 mg/kg/gün) verildi. Deney sonunda alınan kan ve ovaryum dokularında biyokimyasal ve histolojik incelemeler yapıldı. Kan örneklerinde MDA, GSH, Pentraksin-3, TGF- β , AMH ve İnsulin düzeyleri ELİSA ile; Ovaryum doku örneklerinde AMH ve TGF- β gen ekspresyonu PCR tekniği ile; H&E, VEGF, TGF- β ve TUNEL ile boyanmış ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopunda ve folikülleri elektron mikroskopu (EM)'da incelendi.

Bulgular. *DM grubu* sıçanlarda poliüri, polidipsi ve düşük vücut ağırlıkları ile karakterize ağır diyabet semptomları gözlemlendi; kanda ve ovaryum doku homojenatında MDA yüksek düzeydeydi ve Trigliserid, Pentraxin-3 seviyeleri yüksek, HDL-kolesterol ise düşüktü. En fazla atretik follikül ve apoptotik hücre sayısı DM grubundaydı. *DM-Atorvastatin(10) grubunda* ise ovaryum doku homojenatında GSH daha yüksek düzeylerdeydi; bu grupta VEGF, AMH, TGF- β gen ekspresyon düzeyleri artmıştı; atretik follikül ve apoptotik hücre sayısı ise azalmıştı. Ovaryum kesitlerinde fibrotik alanların DM grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi. *DM ve DM-Atorvastatin(20) grubunda* fibrotik alanlar, genişlenmiş kan damarları gözlemlendi; TGF- β foliküller arası alanlarda, damarların etrafında ve hilusta daha fazla gözlemlendi. Kontrol grubuna göre diğer gruplarda daha az VEGF ekspresyonu gözlemlendi ($p<0.05$). EM ile *DM grubunda* granülosa hücre sitoplazmasında yer yer de lipid içeriğinin bozulmuş lamellar tarzda birikimleri gözlemlendi. *DM-A(20) grubunda* da bazı alanlarda az sayıda lipid vaküolleri lamellar tarzda bozulmuş morfolojide gözlemlendi.

Sonuç. *DM grubu* ile karşılaştırmada Atorvastatinin 10mg/kg/gün dozda uygulanması doku koruyucu etkisini ortaya çıkardı. Oysa 20 mg/kg/gün dozda uygulamasında MDA ve Pentraxin-3 düzeylerinin yüksek bulunması ve ovaryum histolojisi bize bu dozda tedavinin toksik etki gösterdiğini düşündürdü.

Anahtar Sözcükler: Diyabet, Atorvastatin, Ovaryum, Sıçan, Oksidatif stress, Apoptozis, Antioksidanlar.

ABSTRACT

Investigation of Biochemical and Histological Effects of Atorvastatin on Diabetic Rat Ovaries

Objectives. Our aim in this study was to investigate the damage of rat ovaries in an Streptozotocin induced diabetes model and to evaluate the tissue protective effects of Atorvastatin treatment.

Method. A drug containing Atorvastatin was administered in 2 different doses (10 and 20 mg/kg/day) for 21 days to Wistar albino STZ-induced diabetic rats. At the end of the experiment, biochemical and histological examinations were performed on blood samples and ovarian tissues. MDA, GSH, Pentraxin-3, TGF β , AMH and Insulin levels were determined in blood samples by ELISA; the expressions of AMH and TGF- β genes were examined in ovarian tissue samples by PCR; Ovarian tissue samples were examined in the sections stained with H&E, VEGF, TGF- β and TUNEL under a light microscope and ovarian follicles electron microscopically (EM).

Findings. In the *DM group* was observed several diabetic symptoms like polyuria, polydipsia and low body weights; MDA shows a high level in the blood and ovarium tissue homogenate; triglyceride and Pentraxin-3 levels were high, HDL-cholesterol was low. The largest number of atretic follicles and apoptotic cells were present in the *DM group*. In *DM-A(10) group*, GSH was higher in ovarian tissue homogenate; in this group VEGF, AMH and TGF- β gene expression levels were high; the number of atretic follicles and apoptotic cells have decreased and fibrotic areas in ovarian sections were observed to be less than the *DM group*. In the *DM and DM-A(20) groups* fibrotic areas, dilated blood vessels were observed; TGF- β was observed more frequently in the follicular spaces, around the blood vessels and in the hilus. According to the control group, less VEGF expression was observed in the other groups ($p < 0.05$). In EM, the granulosa cell cytoplasm of *DM group* occasionally had accumulation in the lamellar form due to impaired lipid content. In the *DM-A (20) group*, in some areas, a small number of lipid vacuoles was observed in the lamellar form of impaired morphology.

Results. In comparison with *DM group*, administration of Atorvastatin at dose 10 mg/kg/day resulted in tissue protective effect. However, high levels of MDA and Pentraxin-3 at a dose of 20 mg/kg/day and ovarian histology suggested that this dose had a toxic effect.

Key Words: Diabetes, Atorvastatin, Ovary, Rat, Oxidative stress, Apoptosis, Antioxidants.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hiçbir konuda benden desteğini esirgemeyen, tez çalışmamda benimle birebir ilgilenen, karşılaştığım sorunların çözümünde elinden gelen yardımı gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Süreyya CEYLAN'a, Biyokimya Anabilim Dalından Doktor Öğretim Üyesi Ceyla ERALDEMİR'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Canan BAYDEMİR'e, KÖGEM'den Doç. Dr. Yusufhan Yazır'a ve Doktor Öğretim Üyesi Gökhan DURUKSU'ya, Marmara Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Feriha ERCANA'a ve eğitimime yapmış oldukları katkılarından dolayı tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Ayşegül ALBAYRAK AYTEKİN, Arş. Gör. Dr. Sema KURNAZ ÖZBEK, Arş. Gör. Sabriye KARADENİZLİ, Arş. Gör. Özgür Doğa ÖZSOY, Arş. Gör. Selenay FURAT RENÇBER, Uzman Kübra KAVRAM ve Arş. Gör. Dr. Özlem Tuğçe KAYA'ya yürekten teşekkür ederim. Ayrıca bize deneylerimizde kullandığımız Atorvastatin preparatlarını temin eden Nobel ilaç firmasına teşekkür ederiz.

Doktora öğrenimime sağladığı burs desteği ile katkıda bulunan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, sevgi ve ilgileriyle bana güç veren ve bana inanan sevgili eşim Agim OSMANİ ve biricik kızlarım Ejona ve Arbana'ya çok teşekkür ederim.

Liridona ADİLİ OSMANİ

KOCAELİ, Haziran 2018

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLGİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan bilgi ve çizimler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin bir yayıdan kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir intihal programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

30 / 05 / 2018
Adı Soyadı
İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ETİK KURUL.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ÇİZİMLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1.GİRİŞ	1
1.1. Ovaryum	1
1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi	1
1.1.2. Ovaryumun Anatomisi	1
1.1.2.1. Ovaryumun Damar ve Sinirleri	2
1.1.3. Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Foliküllerin Gelişimi	3
1.1.3.1. Primordiyal Folikül	5
1.1.3.2. Primer Folikül	5
1.1.3.3. Sekonder Folikül	7
1.1.3.4. Tersiyer (Olgun) Folikül (Graaf Folikülü)	8
1.1.3.5. Atretik Folikül	9
1.1.3.6. EIB Epitelyal İnküzyon Bezleri (Epithelial inclusion glands).....	9
1.1.4. Ovaryumun Fizyolojisi	10
1.1.4.1. Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşması.....	10
1.2. Diabetes Mellitus	11
1.2.1. Diyabetin Sınıflandırılması	12
1.2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus (DM).....	12
1.2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus (DM).....	14
1.2.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM).....	15
1.2.1.4. Diğer Nedenlere Bağlı Olarak Spesifik Diyabet Tipleri.....	15
1.2.2. Diyabetin Komplikasyonları	15
1.2.3. Diyabet Tanı ve Tedavisi	15

1.2.4. Deneysel Diyabet Modelleri	16
1.2.4.1. Streptozotosin.....	17
1.2.5. Diyabetes Mellitus ve Dişı Genital Sistemi	17
1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	18
1.3.1. Antioksidan Sistemler	20
1.3.2. Diyabete Bağlı Oksidatif Stres.....	21
1.3.3. Apoptoz.....	23
1.4. Statinler	23
1.4.1. Atorvastatin'in Etki Mekanizmaları.....	24
1.4.2. Statinlerin Yan Etkileri	24
1.4.3. Statinlerin Pleiotropik Etkileri.....	25
1.4.4. Atorvasatin.....	27
2. AMAÇ.....	29
3. YÖNTEM.....	30
3.1. Deney Hayvanları.....	30
3.2. Sakrifikasyon	31
3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü.....	31
3.4. Glikoz Seviyesinin Ölçümü.....	31
3.5. Biyokimyasal Analiz	31
3.5.1. Doku Homojenizasyonu.....	31
3.5.1.1. Dokuda Protein Tayini	32
3.5.2. Kanda Trigliserid, Kolesterol, TGF- β , AMH, Pentraksin-3, Insulin, MDA ve Glutation Tayini.....	32
3.5.2.1. Trigliserid ve HDL Kolesterol Ölçüm ve Trigliserid ile HDL Kolesterol Oranı...32	
3.5.2.2. TGF- β , AMH, Pentraksin-3 ve İnsulin Ölçümü.....	32
3.5.2.3. İnsulin Direnci Hesaplaması.....	32
3.5.2.4. Malondialdehit (MDA) ve Glutation (GSH) Ölçümü.....	32
3.5.2.5. Glutation (GSH) Ölçümü.....	32
3.6. Işıık Mikroskopi Uygulamaları.....	33
3.6.1. Hematoksilen&Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme.....	33
3.6.1.1. Folikül Sayımı.....	34
3.6.2. İmmünohistokimyasal Uygulamalar.....	34
3.6.2.1. TGF- β İmmünohistokimyası.....	34
3.6.2.2. VEGF İmmünohistokimyası	34

3.6.2.3. İmunohistokimya Mikrografların Kuantifikasyonu (Boyanmanın Rakamsal Hesaplanması) `	35
3.6.2.4. TUNEL Boyaması	35
3.7. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) ile Ultrastrüktürel Yöntemler.....	36
3.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	36
3.9. İstatistiksel Analiz.....	37
3.10. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar.....	37
3.10.1. Kimyasal Malzemeler.....	37
3.10.2. Cihazlar.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Atorvastatinin Glikoz Seviyeleri Üzerinde Etkisi.....	39
4.1.1. Gruplar Arası Açlık Kan Glikoz Değerlerinin Zamana Bağlı Değişimi.....	39
4.1.2. Gruplar İçi Açlık Kan Glikoz Değerlerinin Zamana Bağlı Değişimi.....	41
4.2. Atorvastatinin Vücut Ağırlığı Üzerinde Etkisi	43
4.2.1. Vücut Ağırlıklarının Zamana Bağlı Olarak Grup İçi Değişimi.....	43
4.2.2. Vücut Ağırlıklarının Gruplar Arası Değişimleri.....	47
4.2.3. Hayatta Kalma Oranı.....	48
4.3. Biyokimya Bulguları.....	48
4.3.1. Atorvastatin'in Serum İnsulin Seviyeleri Üzerine Etkisi	48
4.3.2. Atorvastatin'in Serum İnsulin Direnci Üzerine Etkisi.....	50
4.3.3. Atorvastatin'in Serum AMH Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	51
4.3.4. Atorvastatin'in Plazma TGF- β Seviyeleri Üzerine Etkisi	53
4.3.5. Atorvastatin'in Plazma Pentraksin-3 Üzerine Etkisi.....	54
4.3.6. Atorvastatin'in Serum MDA ve GSH Seviyelerin Üzerine Etkisi	55
4.3.7. Atorvastatin'in Lipid Profili Üzerine Etkisi	57
4.3.8. Atorvastatin'in Trigliserid ile HDL Kolesterol Oranı Etkisi.....	59
4.3.9. Atorvastatin'in Ovaryum Dokusu MDA ve GSH Seviyelerin Üzerine Etkisi.....	61
4.4. Hayvanların Makroskopik Değişimleri.....	63
4.5. Işık Mikroskopi Bulguları.....	66
4.5.1. H&E Boyaması ve Folikül Sayımı Bulguları.....	66
4.5.1.1. Korpus Luteum Sayımı.....	84
4.5.1.2. Atretik Foliküllerin Sayımı.....	85
4.5.1.3. Diğer Bulgular.....	86

4.5.2. İmmünohistokimya Bulguları.....	88
4.5.2.1. TGF- β İşaretlemesi.....	88
4.5.2.2. VEGF İşaretlemesi.....	97
4.5.2.3. TUNEL İşaretlemesi ile Apoptotik Hücre Tayini.....	104
4.6. TEM ile Ultrastrüktürel İnceleme.....	112
4.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	117
4.7.1. Ovaryum Dokusu AMH Gen Ekspresyonu.....	117
4.7.2. Ovaryum Dokusu TGF- β Gen Ekspresyonu.....	118
5. TARTIŞMA.....	119
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	127
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	129
ÖZGEÇMİŞ	141

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a.: Arteria

AGE: Advanced Glication End Products (İleri glikasyon son ürünleri)

AMH: Antimüllerian Hormone

Apo-B: Apolipoprotein B

C: Selsius/Santigrat

DAB: Diaminobenzidin

Dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik Asit

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

eNOS: endotelial Nitrik Oksit Sentaz

ER: Endoplazmik Retikulum

F: Folikül

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GİS: Gastro İntestina Sistem

GLUT: Glucose transporter

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

GPX - GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

HDL: High/Yüksek Dansiteli Lipoprotein

H&E: Hematoksilin ve Eozin Boyası

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IU: International Unit

İp: İntraperitoneal

LDL: Low density lipoprotein/Düşük dansiteli lipoprotein

LDL-k: Low Density Lipoprotein-Kolesterol/Düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol

Lig.: Ligamentum

LH: Lüteinizan Hormon

MDA: Malondialdehit

mRNA: messenger RNA

µm: Mikrometre

µ: Mikron

n.: Nervus/Sinir

NAD⁺: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Nm: Nanometre
NO: Nitrik Oksit
O₂: Oksijen
OD: Optik Yoğunluğu/ Optical Density
OsO₄: Osmiyum Tetraoksit
OS: Oksidatif Stres
PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu/ Phosphate Buffer Saline
PGH- Primordial Germ Hücreleri
RNT: Reaktif Nitrit Türleri
ROT: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm: Dakikada Dönüm Sayısı
Sn: Saniye
SOD: Süperoksit Dismutaz
TBA: Tiyobarbitürik Asit
TG: Trigliserit
TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta / Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
T-PBS: Tween'li Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
TUNEL: TdT-dUTP Nick-End- Labelling
UV: Ultraviyole
v.: Vena
VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Dişi üreme sisteminin genel görüntüsü.....	3
Çizim 1.2. Ovaryumun genel görüntüsü ve folikülogenez.....	4
Çizim 1.3. Primordiyal folikül.....	5
Çizim 1.4. Unilaminer primer folikül.....	6
Çizim 1.5. Multilaminer primer folikül.....	6
Çizim 1.6. Sekonder folikül.....	7
Çizim 1.7. Graaf folikül.....	8
Çizim 1.8. Atretik folikül.....	9
Çizim 1.9. Ovaryan ve uterin fizyolojik döngüleri.....	11
Çizim 1.10. Tip 1 Diabetes Mellitus'ta İnsulin yetersizliği.....	12
Çizim 1.11. Tip 2 Diabetes Mellitus'ta İnsulin direnci ve GLUT 4'ün etkisi.....	14
Çizim 1.12. Reaktif Oksijen Türleri ROT.....	18
Çizim 1.13. Antioksidan sisteminin şematik görüntüsü.....	20
Çizim 1.14. Hiperglisemi doku hasar mekanizmaları.....	21
Çizim 1.15. Statinlerin kolesterol sentezine etkisi.....	24
Çizim 1.16. Atorvastatin'in kimyasal yapısı.....	27
Çizim 4.1. Gruplar arası açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	40
Çizim 4.2. Gruplar içi açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	42
Çizim 4.3. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının grup içi günler arası değişimleri.....	45
Çizim 4.4. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası değişimleri.....	46
Çizim 4.5. Deney hayvanlarının farklı gruplarda hayatta kalma oranının karşılaştırılması.....	47
Çizim 4.6. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum İnsulin seviyelerinin karşılaştırılması.....	48
Çizim 4.7. Deney hayvanlarının grup içi İnsulin ve glikoz seviyelerinin karşılaştırılması.....	49
Çizim 4.8. Deney hayvanlarının farklı gruplarda İnsulin direnci (HOMA-IR)'nin karşılaştırılması.....	50
Çizim 4.9. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum AMH (Anti Mullerian Hormon) seviyelerinin karşılaştırılması.....	51

Çizim 4.10. Deney hayvanlarının farklı gruplarda Plazma TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) seviyelerinin karşılaştırılması.....	52
Çizim 4.11. Deney hayvanlarının farklı gruplarda Plazma Pentraksin-3 seviyelerinin karşılaştırılması.....	53
Çizim 4.12. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.....	54
Çizim 4.13. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması.....	55
Çizim 4.14. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda serum HDL (High Density Lipoprotein) Kolesterol seviyelerinin karşılaştırılması.....	57
Çizim 4.15. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda serum Trigliserid seviyelerinin karşılaştırılması.....	58
Çizim 4.16. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda Trigliserid ile HDL-Kolesterol oranının karşılaştırılması.....	59
Çizim 4.17. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda ovaryum dokusu MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.....	60
Çizim 4.18. Deney hayvanlarının farklı gruplarda ovaryum dokusu GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması.....	61
Çizim 4.19. Diyabet ve sağlıklı gruba ait iki sıçanın görünümü.....	62
Çizim 4.20. DM-A(10) grubuna ait bir sıçanda boyun bölgesinde açık bir lezyon'un görünümü.....	63
Çizim 4.21. Diyabet gruplarına ait sıçanlarda GİS'in görünümü.....	64
Çizim 4.22. DM grubuna ait sıçanların kalpte gözlenen değişiklikler.....	65
Çizim 4.23. Kontrol grubu, C seriden genel görünümü.....	66
Çizim 4.24. Kontrol grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.....	67
Çizim 4.25. Kontrol grubunda düzgün görünümlü korpus luteum.....	68
Çizim 4.26. Kontrol grubunda bir atretik folikülün görünümü.....	68
Çizim 4.27. DM grubu C seriden farklı örnekler için genel görünüm.....	69
Çizim 4.28. DM grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.....	70
Çizim 4.29. DM grubunda folikülleri, geniş fibrotik alanlar ve genişlenmiş kan damarları.....	71
Çizim 4.30. DM grubunda tersiyer folikül ve etrafında korpus luteumlar.....	71
Çizim 4.31. DM grubunda atretik bir folikülün görünümü.....	72
Çizim 4.32. DM-A(10) grubunda B ve C seriden ovaryumun genel histolojik görünümü..	73

Çizim 4.33. DM-A(10) grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.....	73
Çizim 4.34. DM-A(10) grubuna ait korpus luteumun görünümü.....	74
Çizim 4.35. DM-A(10) grubuna ait atretik foliküllerin görünümü.....	74
Çizim 4.36. DM-A(20) grubunda C seriden ovaryumun genel histolojik görünümü.....	75
Çizim 4.37. DM-A(20) grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.....	75
Çizim 4.38. DM-A(20) grubunda ortaya çıkan kistik oluşumlar.....	76
Çizim 4.39. DM-A(20) grubuna ait korpus luteumun görünümü.....	76
Çizim 4.40. DM-A(20) grubuna ait atretik folikülün görünümü.....	77
Çizim 4.41. K-A(10) grubu ovaryumun genel histolojik görünümü.....	77
Çizim 4.42. K-A(10) grubuna ait çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.....	78
Çizim 4.43. K-A(10) grubuna ait düzgün görünümlü korpus luteum.....	78
Çizim 4.44. K-A(10) grubuna ait bir atretik folikülün görünümü.....	79
Çizim 4.45. K-A(20) grubu C seriden ovaryumun genel histolojik görünümü	79
Çizim 4.46. K-A(20) grubunda genişlenmiş kan damarları ve hemoraji.....	80
Çizim 4.47. K-A(20) grubuna ait düzgün görünümlü korpus luteum.....	80
Çizim 4.48. K-A(20) grubuna ait bir atretik folikülün görünümü.....	81
Çizim 4.49. Deney hayvanlarının farklı gruplarda primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder ve Graff foliküllerin karşılaştırılması.....	82
Çizim 4.50. Deney hayvanlarının farklı gruplarda korpus luteum sayılarının karşılaştırılması.....	83
Çizim 4.51. Deney hayvanlarının farklı gruplarda atretik folikül sayılarının karşılaştırılması.....	84
Çizim 4.52. Kontrol grubuna ait EİB (Epitelial İnklüzyon Bezi) görünümü.....	85
Çizim 4.53. DM grubunda oosit ve korona radiata hücrelerin görünümü.....	86
Çizim 4.54. DM-A(20) grubunda iki oositli folikülün görünümü.....	87
Çizim 4.55. Kontrol grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.....	88
Çizim 4.56. Kontrol grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.....	88
Çizim 4.57. Kontrol grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 40X	89
Çizim 4.58. DM grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.....	89
Çizim 4.59. DM grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.....	90
Çizim 4.60. DM grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 40X.....	90
Çizim 4.61. DM-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.....	91
Çizim 4.62. DM-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 40X.....	91

Çizim 4.63. DM-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.....	92
Çizim 4.64. DM-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.....	92
Çizim 4.65. K-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.....	93
Çizim 4.66. K-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.....	93
Çizim 4.67. K-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.....	94
Çizim 4.68. K-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.....	94
Çizim 4.69. Deney hayvanlarının farklı gruplarda ovaryum doku kesitlerdeki TGF- β (optikal densitesi) OD seviyelerinin karşılaştırılması.....	95
Çizim 4.70. Kontrol grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.....	96
Çizim 4.71. Kontrol grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 40X.....	97
Çizim 4.72. DM grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.....	97
Çizim 4.73. DM grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.....	98
Çizim 4.74. DM-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.....	98
Çizim 4.75. DM-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.....	99
Çizim 4.76. DM-A(20) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.....	99
Çizim 4.77. DM-A(20) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.....	100
Çizim 4.78. K-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.....	100
Çizim 4.79. K-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.....	101
Çizim 4.80. K-A(20) gruba ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.....	101
Çizim 4.81. K-A(20) gruba ovaryumda VEGF ekspresyonu, 40X.....	102
Çizim 4.82. Deney havanlarının farklı gruplarda ovaryum doku kesitlerindeki VEGF (optikal densitesi) OD seviyelerinin karşılaştırılması.....	103
Çizim 4.83. Kontrol grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf.....	104
Çizim 4.84. DM grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograflar.....	105
Çizim 4.85. DM-A(10) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf.....	106
Çizim 4.86. DM-A(20) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf.....	106
Çizim 4.87. K-A(10) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf.....	107
Çizim 4.88. K-A(20) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf.....	107
Çizim 4.89. Deney havanların farklı gruplarda ovaryum dokun kesitlerindeki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması.....	108
Çizim 4.90. Kontrol grubuna ait elektron mikrograf.....	110
Çizim 4.91. DM grubuna ait elektron mikrograf.....	111
Çizim 4.92. DM-A(10) grubuna ait elektron mikrograf.....	112
Çizim 4.93. DM-A(20) grubuna ait elektron mikrograf.....	113

Çizim 4.94. K-A(10) grubuna ait elektron mikrograf.....	114
Çizim 4.95. K-A(20) grubuna ait elektron mikrograf.....	115
Çizim 4.96. Deney havanlarının farklı gruplarda doku AMH (Anti Mullerian Hormon) gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	116
Çizim 4.97. Deney havanlarının farklı gruplarda doku TGF- β gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	117



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Gruplar arası açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	39
Çizelge 4.2. Gruplar içi açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri	41
Çizelge 4.3. Grup içi deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının günler arası değişimleri....	44
Çizelge 4.4. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası değişimleri.....	46
Çizelge 4.5. Deney hayvanlarının serum İnsulin seviyelerinin karşılaştırılması.....	48
Çizelge 4.6. Deney hayvanlarının farklı gruplarda İnsulin direnci: HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance) 'nin karşılaştırılması.....	49
Çizelge 4.7. Deney hayvanlarının serum AMH (Anti Mullerian Hormon) seviyelerinin karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.8. Deney hayvanlarının plazma TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) seviyelerinin karşılaştırılması.....	52
Çizelge 4.9. Deney hayvanlarının plazma Pentraksin-3 seviyelerinin karşılaştırılması.....	53
Çizelge 4.10. Deney hayvanlarının serum MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4.11. Deney hayvanlarının serum GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması.....	55
Çizelge 4.12. Deney hayvanlarının serum HDL-Kolesterol seviyelerinin karşılaştırılması.....	56
Çizelge 4.13. Deney hayvanlarının serum Trigliserid seviyelerinin karşılaştırılması.....	68
Çizelge 4.14. Deney hayvanlarının Trigliserid ile HDL-Kolesterol oranlarının karşılaştırılması.....	59
Çizelge 4.15. Deney hayvanlarının ovaryum dokusu MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.....	60
Çizelge 4.16. Deney hayvanlarının ovaryum dokusu GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması.....	61
Çizelge 4.17. Kontrol, DM ve tedavi gruplarındaki primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder ve Graff foliküllerin sayıları.....	82
Çizelge 4.18. Kontrol, DM ve tedavi gruplarındaki korpus luteum sayılarının karşılaştırılması.....	83
Çizelge 4.19. Kontrol, DM ve tedavi gruplarındaki atretik folikülerin sayılarının karşılaştırılması	84

Çizelge 4.20. Ovaryum doku kesitlerdeki TGF- β optikal densitesi (OD) seviyelerinin karşılaştırılması.....	95
Çizelge 4.21. Ovaryum doku kesitlerdeki VEGF optikal densitesi (OD) seviyelerinin karşılaştırılması.....	102
Çizelge 4.22. Ovaryum doku kesitlerdeki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması.....	108
Çizelge 4.23. Ovaryum dokusu AMH gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	116
Çizelge 4.24. Ovaryum dokusu TGF- β gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	117



Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIğI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen ünvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır.).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönün dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan ünvanlar BİLİM UZMANLIğI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü müdürünün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfa i, ii, iii şekilde Roma rakamları onuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıraya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

30 / 05 / 2018

Danışman

İmza

1. GİRİŞ

1.1. Ovaryum

1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Gonadal cinsiyet, fertilizasyon sırasında belirlenen genetik cinsiyet sonucunda oluşmaktadır. Embriyonun genetik cinsiyetinin fertilizasyon aşamasında belirlenmiş olmasına rağmen, gonadlar cinsiyete özgü morfolojik özelliklerini fertilizasyonun yedinci haftasına, 44. gününe kadar kazanmamış olurlar (Moore ve Persaud 2009, Sadler 2006).

Her iki cinsiyette de gonadların oluşması ve farklılaşması primordial germ hücrelerinin (PGH) ara (intermediate) mezoderm bölgesine gelmesiyle başlar. PGH'i yolk kesesi duvarındaki hücrelerden fertilizasyon sonrası 4. haftada farklılaşır. 4 ile 6. haftalar arasında PGH'i ameboid hareketler ile ilkel barsağın etrafındaki dorsal mezenter yolu ile vücudun arka duvarına doğru göç eder. İlk PGH'ler 5. haftada 10. torasik omurga düzeyinde iki yanında karın arka duvarına göç ederler, gevşek mezenkimal doku içine yerleşirler ve burada mitoz ile çoğalmaya başlıyor. Gelişen ovaryumlarda destek hücreleri (sölom epitelinden kayanaktan folikül epitel hücreleri ve mezenkimal hücreler) PGH etrafında toplanırlar. Oogonyumla somatik destek hücrelerinin karşılıklı etkileşimi sonucu yumurtalığın ovaryumu korteks kısmı içinde primordiyal foliküller oluşur (Moore ve Persaud 2009, Schoenwolf 2009).

Sölom epitelinin proliferasyonu ile primer cinsiyet kordonları gelişir. 7. haftada ise ovaryum yüzey epitelinin proliferasyonu ile sekonder cinsiyet kordonları gelişir. Oogonyumlar yoğun bölünmeler geçirerek intrauterin yaşamın 2. ayında yaklaşık 600.000'e, 5. ayında ise 7 milyonun üzerinde bir sayıya ulaşır. 3. aydan başlayarak oogonyumlar 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girer ve profazın diploten evresinde kalarak primer oositlere dönüşür (Ovalle 2013). Doğuma kadar mevcut oositlerin \approx %80'i atreziye uğrar ve yeni doğan bebekte yaklaşık 600.000-800.000 folikül bulunur (Moore ve Persaud 2009). Bu sayı adolesan dönemde 40.000'in altına iner ve foliküller atreziye birlikte 40-45 yaşlarında geriye yaklaşık 8.000 oosit kalır (Anthony 2013, Moore ve Persaud 2009).

1.1.2. Ovaryumun Anatomisi

Dişi üreme sisteminin ovariumlar erkeklerdeki testislerin karşılığı olup uterusun her iki yanında yerleşmiş bir çift organdır (Liu ve diğ 2010, Eroschenko 2001).

Ovaryumlar, fossa ovarica (yumurtalık çukuru) içine yerleşmişlerdir. Fossa ovarica adı verilen bu çukur, a. iliaca externa ile a. iliaca interna arasında yer alır. Bu çukur, yukarıdan a. iliaca externa, aşağı ve ön taraftan lig. latum uterinin tabanı ve arkadan ise ureter ile sınırlanmaktadır (Ovalle ve Nahirney 2013).

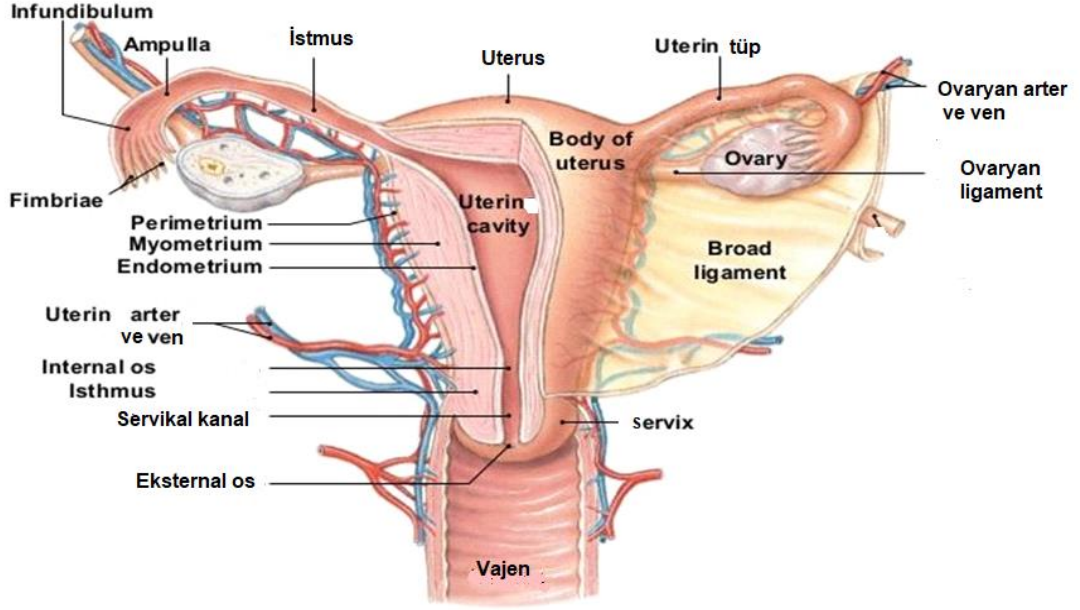
Facies medialis- iç ve facies lateralis- dış olmak üzere iki yüzü; ön- margo mesovaricus (mezoovaryan) ve arka- margo liber (serbest) olmak üzere iki kenarı; ekstremitas tubaria-tubal (üst) ve ekstremitas uterina- uterin (alt) olmak üzere iki ucu vardır. Ön kenar olan margo mesovaricus düz olup kısa bir peritoneal plika olan mesovarium lig. latum uteriye bağlanır. lig. suspensorium ovarii (infundibulopelvik bağ) ile ovaryum pelvik duvara bağlanır (Mader 2004, Standring 2005, Scanlon 2007). Çizim 1.1.

1.1.2.1 Ovaryumun Damar ve Sinirleri

Ovaryum arterleri: Ovaryumlara kan getiren esas damar ovaryan arter (arteria ovarica) olup, abdominal aortanın dallarından biri olmaktadır. A. renalis altında aortadan ayrılır. Ovaryumların kanlanması sağlayan ikincil damar ise arteria uterinanın ovaryan dalıdır (ramus ovaricus). Mezovaryumda, ovaryumlara kan getiren ramus ovaricus ile a. ovarica anastomoz yaparlar. Arterler ovaryuma hilustan girerek medulla ve korteks sınırında pleksus meydana getirmektedir (Arıncı ve Elhan 2001, Waugh ve Grant 2001).

Ovaryum venleri: Ovaryum venleri ovaryan arterlerle birlikte yükselir ve pampiniform pleksus oluşturur. Karın boşluğunda sağ ovaryan ven inferiyor vena kavaya (v. cava inferior), sol ovaryan ven ise sol renal vene (v. renalis sinistra) açılmaktadır (Standring 2005, Arıncı ve Elhan 2001, Waugh ve Grant 2001).

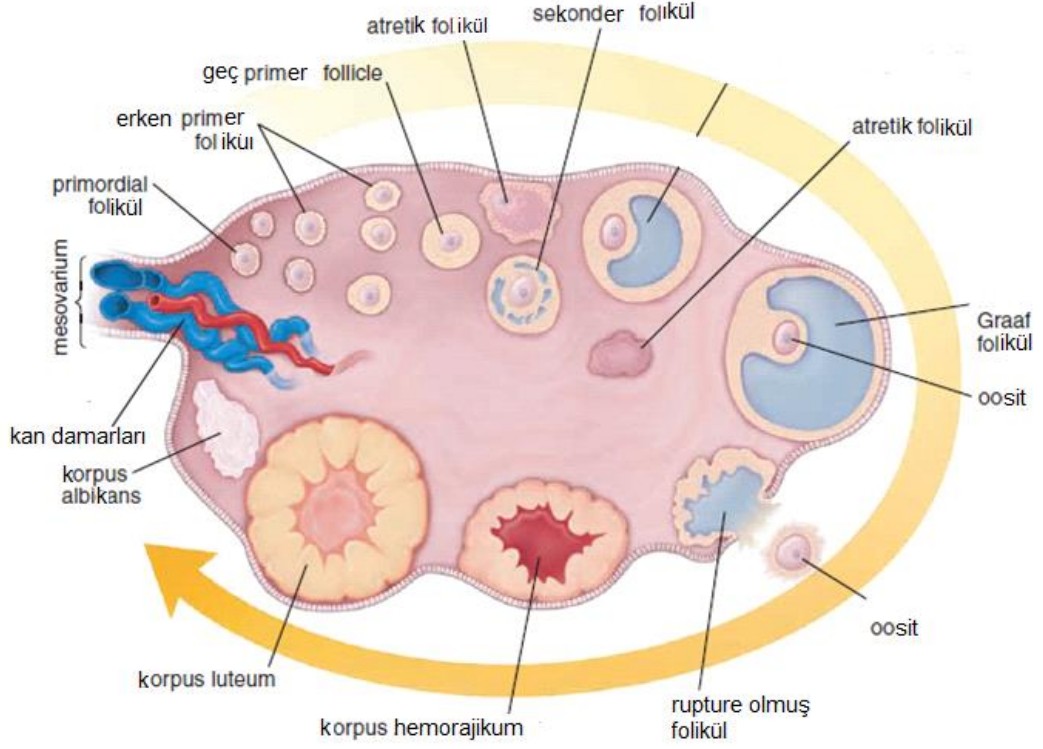
Ovaryum innervasyonu: Ovaryuma ait sinirler ovaryan arter etrafında yer alan ovaryan pleksus aracılığıyla gelir. Otonom sisteme ait sempatik lifler (n. Splanchnicus minor) aracılığı ile gelirken, parasempatik lifleri vagus siniri (n. vagus) aracılığı ile gelir (Gökmen 2003, Arıncı ve Elhan 2001) (Çizim 1.1.).



Çizim 1.1. Dişi üreme sisteminin genel görüntüsü.

1.1.3. Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Foliküllerin Gelişimi

Ovaryum, tek katlı yassıdan kübiğe kadar değişiklik gösteren germinal denilen bir yüzey epiteli ve yüzey epitelinin hemen altında beyazımsı rengini veren ve tüm ovaryumu bir kapsül gibi saran tunika albuginea denilen sıkı bağ dokusu ile çevrilmiştir (Ross 2011). Makroskobik olarak dışta korteks ve içte medulla kısımlarından oluşmuştur. Ovaryumda korteks gelişirken medulla geriliyor. Korteks ise dışta, ovaryumun çevresinde medullayı çevreleyen, folikülleri içeren hücreden zengin kısımdır. Medulla, damardan zengin gevşek fibroelastik bağ doku yapısındadır. Histolojik özellikleri birbirinden farklı olan bu iki bölüm arasında keskin bir sınır bulunmamaktadır (Eşrefoğlu 2004). Çizim 1.2.



Çizim 1.2. Ovaryumun genel görüntüsü ve folikülogenez.

Korteks stroması içinde çeşitli gelişme evrelerinde ovaryum follikülleri yerleşmiştir.

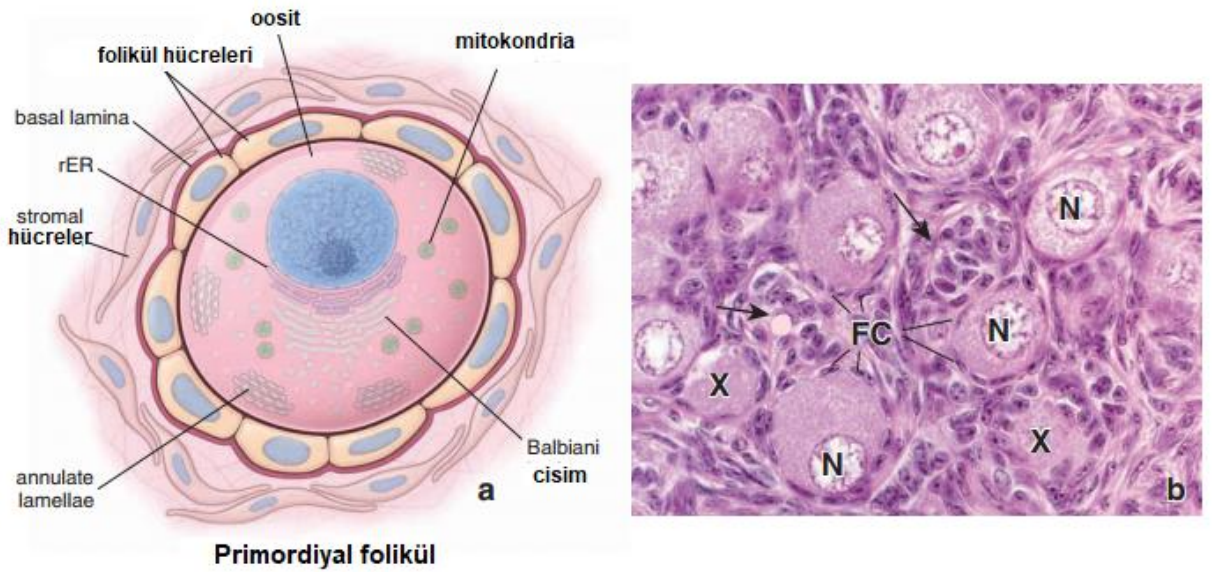
Histolojik olarak ovaryumda 3 temel folikül tipi tanımlanmıştır:

- Primordiyal Folikül
- Olgunlaşan Folikül
 - Primer Folikül (unilaminar primer ve multilaminar primer folikül)
 - Sekonder Folikül
- Graaf Folikülü (Olgun Folikül)

1.1.3.1. Primordiyal Folikül

Primordiyal foliküller, tunika albugineanın hemen altında gruplar halinde bulunan oositi saran tek katlı yassı folikül hücrelerinden oluşmaktadır (Sadler 2010). Primordiyal foliküldeki oosit $\approx 30 \mu\text{m}$ çapında küre şeklinde bir hücredir. Hafifçe eksantrik yerleşmiş büyük bir nükleusu ve iri bir nükleolusu bulunmaktadır. Balbiani cisimcikleri; Golgi zarları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum, sentrioller, mitokondri ve lizozomların lokalize bir birikimi olarak ortaya çıkmaktadır (Ross 2016).

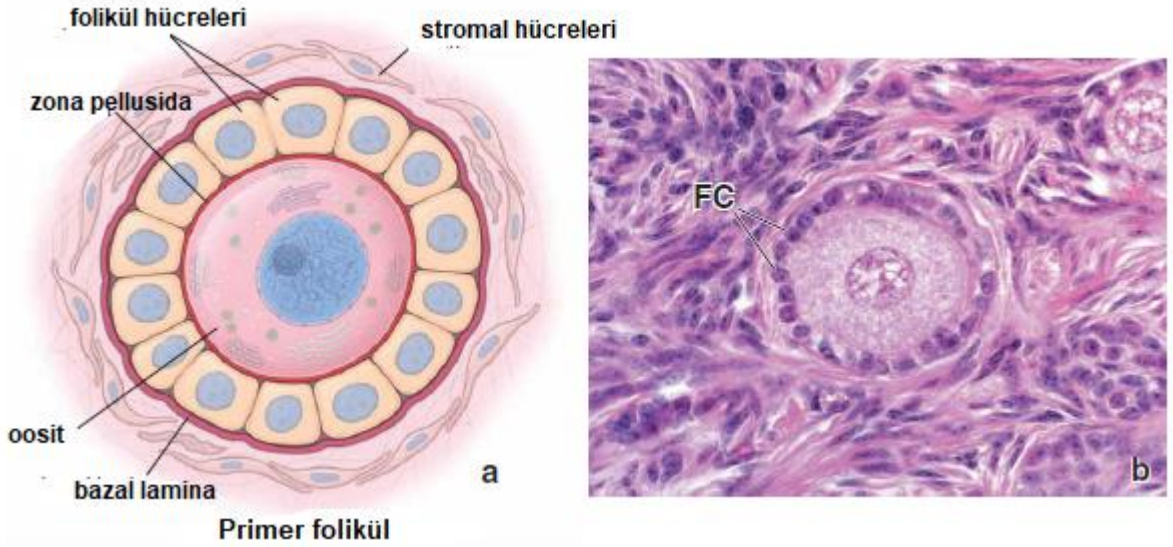
FC- foliküller hücreleri; X-foliküller; N-nukleuslar



Çizim 1.3. Primordiyal folikül (Ross 2016).

1.1.3.2. Primer Folikül

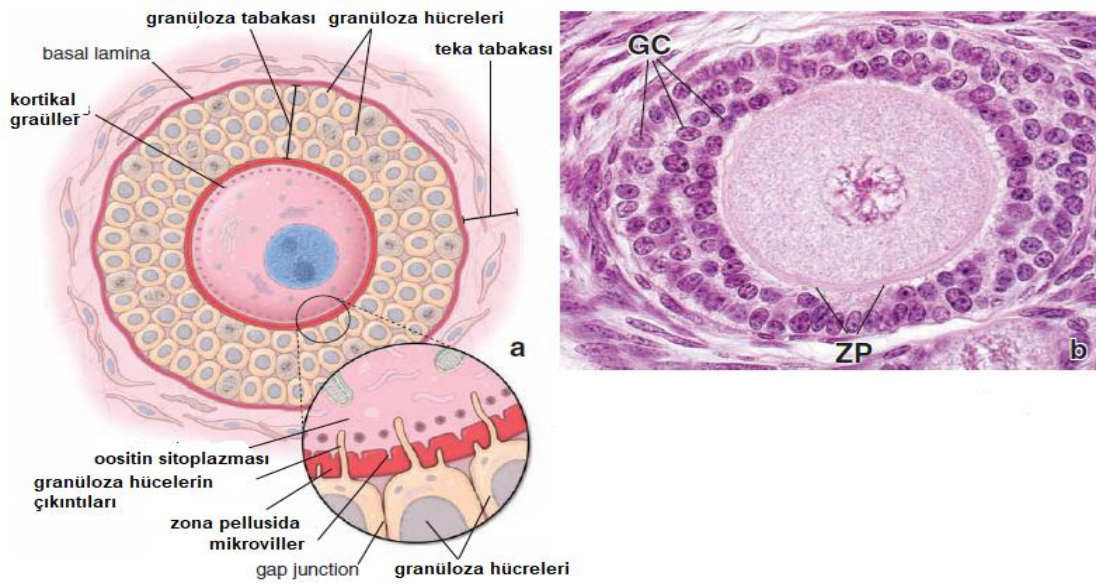
Oosit büyürken, folikülü çevreleyen hücreler çoğalarak kübik hal alır. Bu aşamada folikül primer folikül olarak tanımlanır. Oosit büyüdükçe, spesifik proteinler salgılanmaya başlar, zona pellusida denilen hücre dışı bir membranda biriktiriyorlar (Ross 2016).



FC- foliküller hücreleri

Çizim 1.4. Unilaminar Primer folikül (Ross 2016).

Hızlı mitotik çoğalması sayesinde, tek katlı folikül hücreleri, stratifiye epitelyum oluşumuna neden olur ve oositi çevreleyen membrana granulozu (stratum granulosum) ortaya çıkar. Folikül hücreleri şimdi granuloza hücreleri olarak tanımlanmaktadır. Granuloza hücreleri çoğaldıkça, stromal hücreleri hemen folikülü çevreliyor, bazal laminaya dış tarafından theca folliculi olarak bilinen bağ doku hücrelerinden oluşan bir kılıf oluşturuyor (Ross 2016).

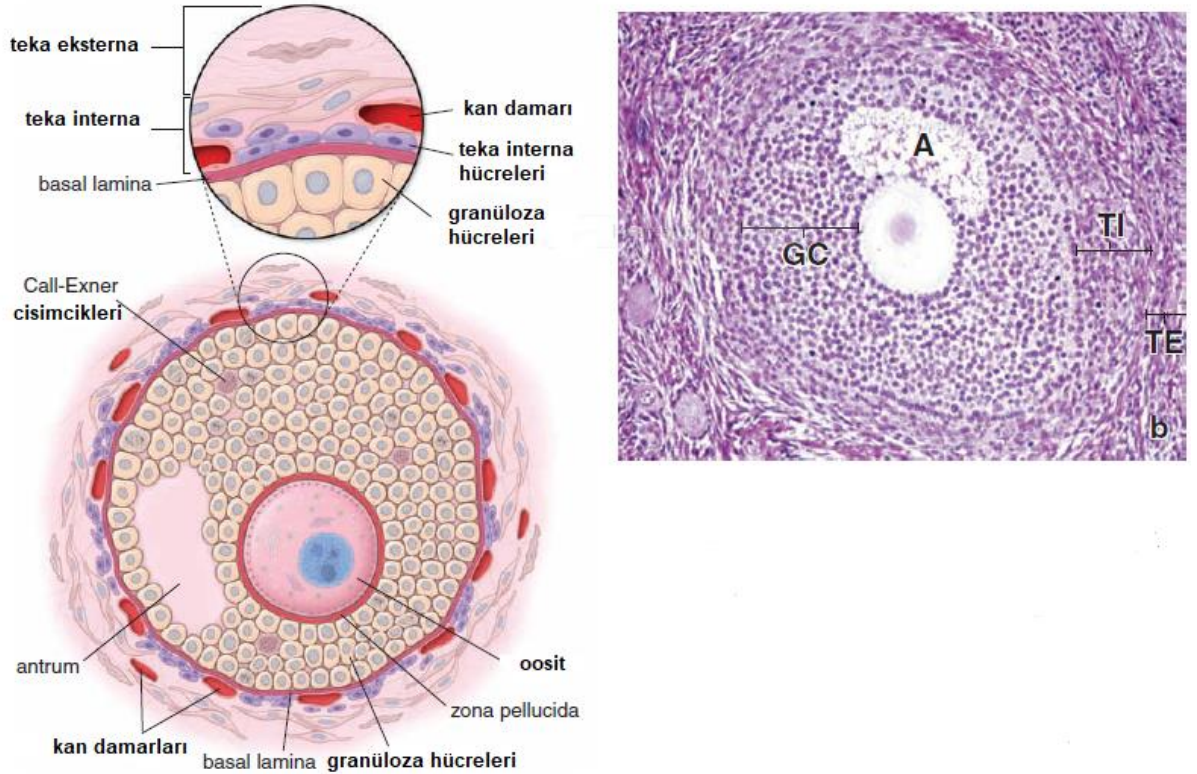


Çizim 1.5. Multilaminar Primer folikül (Ross 2016)

GC-granüloza hücreleri; ZP- zona pellusida.

1.1.3.3. Sekonder Folikül

Stratum granulosum 6 ila 12 hücre tabaka olduğunda, sıvı ile dolu boşluklar granuloza hücreleri arasında görünmeye başlar (Çizim 1.6). Likör folikülü denilen sıvı granuloza hücreleri arasında birikmeye devam ettikçe, boşluklar birikir ve antrum denilen tek, hilal şeklinde bir boşluk oluştururlar. Folikül şimdi sekonder folikül veya antral folikül olarak tanımlanmaktadır. ≈ 125 mm'lik bir çapa ulaşan ksantrik olarak yerleştirilmiş oosit, daha fazla büyümeye maruz kalmaz. Stratum granulosum oosit ile ilintili bölge haricinde, nispeten düzgün ve eşit bir kalınlığa sahiptir. Burada granuloza hücreleri, antruma doğru uzanan kalınlaşmış bir tepcik, kümülüs ooforus oluşturur. Oositi hemen çevreleyen ve ovulasyonda onunla birlikte kalan kumulus ooforus hücreleri, korona radiata olarak adlandırılır.

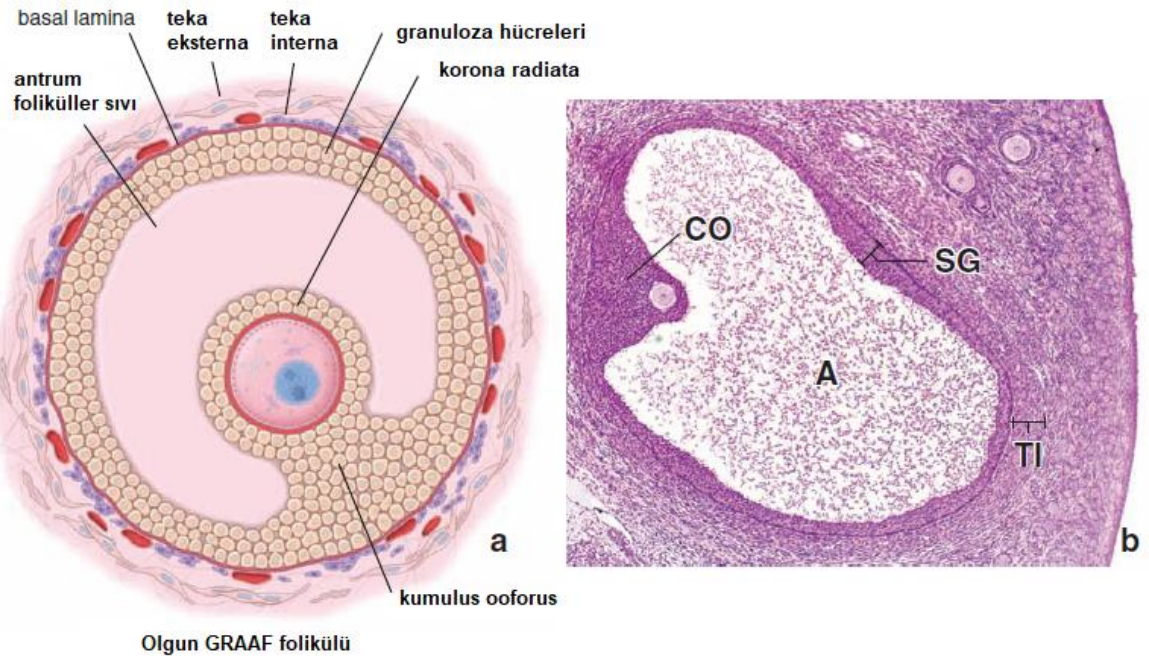


Çizim 1.6. Sekonder folikül (Ross 2016)

A-antrum; GC-granüloza hücreleri; TI-teka interna; TE-teka eksterna.

1.1.3.4. Tersiyer (Olgun) Folikül (Graaf Folikülü)

Graaf folikül olarak da bilinen olgun folikülün çapı 10 mm veya daha fazladır. Geniş boyutu nedeniyle ovaryum korteksinin tam kalınlığına kadar uzanır ve ovaryum yüzeyinde bir çıkıntı oluşturur. Folikül maksimum boyuta yaklaştıkça, granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Oosit, kümülüs ooforus adı verilen granüloza hücrelerinden oluşan bir sap ile folikül duvarına bağlanır (Çizim 1.7). Ovulasyon esnasında oosit ve oositi çevreleyen korona radiata, kümülüs ooforustan ayrılır ve oosit-zona pellusida-korona radiata kompleksi folikül sıvısı içinde serbest olarak yüzer. LH (Lutenizasyon hormonu) pik dalgalanmasına yanıt olarak, granüloza hücreleri üzerindeki LH reseptörleri duyarısızlaştırılmıştır ve granuloza hücreleri artık LH'ya tepki olarak östrojen üretmemektedir. Bu dalgalanma tarafından tetiklenen, primer oositin ilk mayoz bölünmesi devam eder ve sekonder oosit ve ilk polar cismin oluşumuyla sonuçlanır.



Çizim 1.7. Graaf folikül (Ross 2016)

A-antrum; CO-kumulus ooforus; SG- granüloza tabakası; TI-teka interna.

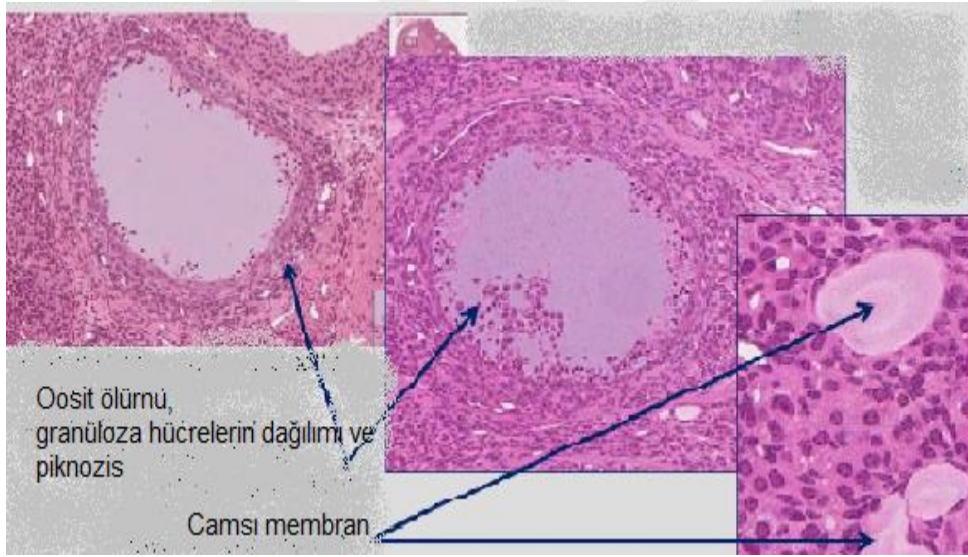
1.1.3.5. Atretik Folikül

Foliküllerin çoğu, ovarian foliküler atrezisi adı verilen bir süreçte dejenere olarak kaybolur. Atreziyi granüloza hücrelerinin apoptosisi başlatır. Çok sayıda folikül, fetal gelişim, erken pstnatal yaşam ve ergenlik döneminde atreziye maruz kalmaktadır.

Puberteden sonra, her menstrual siklusun sırasında bir grup foliküller gruplar halinde olgunlaşmaya başlar ve sadece bir folikül olgunlaşmasını tamamlar.

Foliküler değişiklikler aşağıdaki sırayla devam eder:

- Granuloza hücrelerinde apoptosisin başlatılması, mitozun durdurması ve granuloza hücreleri içindeki endonükleazlar ve diğer hidrolitik enzimlerin ekspresyonu.
- Granuloza tabakasının nötrofiller ve makrofajlarla invazyonu.
- Granuloza tabakasının vaskülarize bağ dokusu lifleri ile invazyonu
- Granuloza hücrelerinin folikülün antrumuna dökülmesi
- Teka interna hücrelerinin hipertrofisi
- Dejenerasyon devam ettikçe folikülünün yıkılması
- Folikül boşluğuna bağ dokusunun invazyonu (Ross 2016).



Çizim 1.8. Atretik folikül

1.1.3.6. EIB Epitelyal İnküzyon Bezleri (Epithelial Inclusion Glands)

Yüzey epitelyumunun ovaryumun içinde invazyonları inklüzyon kistlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu inklüzyon kistlerinde ovaryum yüzey epitelyumu metaplazi ve neoplaziye uğrabilir. Bazı araştırmacılara göre, bu inklüzyon kistlerinin ovulasyon alanı etrafındaki invaginasyonlardan oluşturuluyor. Onlar polikistik ovary sendromu (PCOS)'nda belirgin olduğu bildirilmiştir. Bu oligoovulasyon ve

anovülasyon ile tanımlanan bir durumdur. Diğerleri, normal ovaryumda bulunmayan müllerian duktal epitel içeren kistlerdir, ovaryum epitelyal kanserlerinin nedeni olduğunu ve aynı anda fallop tüpü ve peritoneal kanserler için ortak bir bağlantıyı temsil ettiğini belirtmişlerdir (Dubeau 2008, Strauss III ve Barbieri 2014).

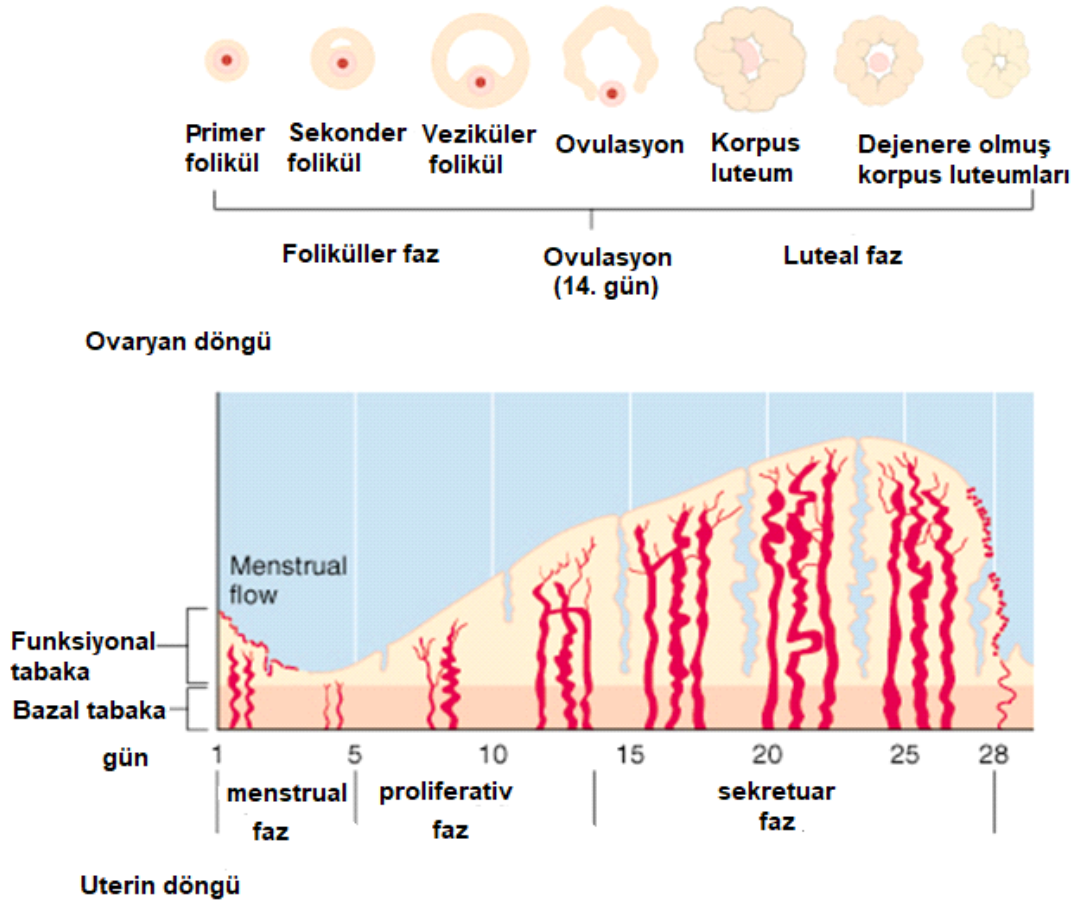
1.1.4. Ovaryumun Fizyolojisi

Ovaryum, dişi oosit hücrelerinin üretilmesi ve hormonların sentezlenmesi ile salgılanarak fonksiyonlarını gerçekleştirmektedir. Hipotalamusta sentezlenen gonadotropin serbestleştirici hormona (GnRH) yanıt olarak ön hipofiz hormonlarından luteinizan hormonu (LH) ve folikül stimülan hormonu (FSH) salgılanır. Ön hipofiz bezinden salgılanan bu iki hormona yanıt olarak ovaryum tarafından progesteron ve östrojen salgılanır (Mader 2004). Östrojen iç ve dış genital organların büyümesinden ve pubertede dişi cinsiyet karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Östrojen sentezi öncelikle LH tarafından uyarılmış teka interna hücrelerinin androjen sentezlemesiyle başlamaktadır. Daha sonra granüloza hücreleri FSH'nin etkisiyle üretilen androjenleri östrojene dönüştürmektedir (Ross 2011). Progesteron, teka hücreleri tarafından sentezlenerek menstrual siklusun ikinci yarısında uterusu döllenmiş yumurtanın implantasyonuna hazır hale getirir. Ayrıca memedeki salgı yapıcı oluşumların gelişimlerini sağlamaktadır (Guyton ve Hall 2006).

1.1.4.1. Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşması

Puberte ile birlikte folikülogenez başlar. Folikülogenez süreci her folikül için 84 gün sürer. Folikül içindeki primer oosit bu dönemde 1. mayozun profaz 1 evresinden 2. mayozun metafaz 2 evresine kadar ilerler (Mazaud ve diğ. 2002, Delilbaşı 2008, Hawkins ve Matzuk 2008). Ovulasyondan kısa bir süre önce ya da ovulasyon anında primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamlar ve 23 çift yapılmış kromozom taşıyan diploit miktarda iki hücre oluşur. Birinci hücre büyüktür ve sekonder oosit adını alır. Diğer hücre ise çok küçüktür ve 1. polar cisim adını alır. Sekonder oosit hemen 2. mayoz bölünmeye girer, ancak bölünmeyi fertilizasyondan sonra tamamlar (Karaöz 2002). Ovülasyondan önceki son 7 günde seçilen foliküllerden bir tanesi baskın hale geçerek ovülasyondan önceki son 24 saatte ise LH pikiyle bu foliküldeki oosit ovülasyonla birlikte atılır (Mazaud ve diğ. 2002, Gardner 2008). Ovulasyon, sekonder oositin Graaf folikülünden atılmasıdır. Ovulasyondan sonra folikülde kalan granüloza ve teka hücrelerinden oluşan duvar, derin katlantılar yapar ve teka internadaki kapillerler folikül lümenine akar; böylece korpus hemorajikum meydana gelir. Granüloza ve teka interna

tabakasındaki hücrelerin sitoplazmalarında bulunan lipit damlacıklarının miktarı artar; hücreler teka lutein ve granüloza lutein hücrelerine dönüşür. Bu durum luteinizasyon olarak adlandırılır ve oluşan bu yapıya korpus luteum (sarı cisim) adı verilir. Korpus luteum, progesteron ve östrojen salgılar; bu sayede endometriyumun gelişmesini ve sekretuar aktivitesini stimüle ederken endometriyumu zigotun implantasyonu için hazırlar (Ross 2011).



Çizim 1.9. Ovaryan ve uterin fizyolojik döngüleri.

1.2. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozuklukla karakterize olmaktadır. Yüksek kan glikoz seviyeleriyle seyreden ve vücutta pek çok sistemi etkileyerek yaşam boyu devam eden bir hastalıktır (Guyton ve Hall 2001). Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği tarafından benzer bir tanı verilmiş: Diyabet (Şeker Hastalığı) insülin hormonunun eksikliği veya etkisizliği sonucu oluşan, ömür boyu süren bir hastalıktır (TEMD Diyabet Çalışma Grubu, 2018).

Dünya sağlık örgütüne (WHO) göre Dünya genelinde ölümlerin % 5'inden fazlası diyabetten kaynaklanmaktadır. 2010 yılında 220 milyon olan diyabetli hasta sayısının, 2025'de 300 milyonu aşması kaçınılmaz görülmektedir. Dünya genelinde \approx 382 milyon insanın, yani toplam nüfusun % 8.3'ünün, diyabet olduğu tahmin edilmektedir (Guariguata ve diğ. 2014).

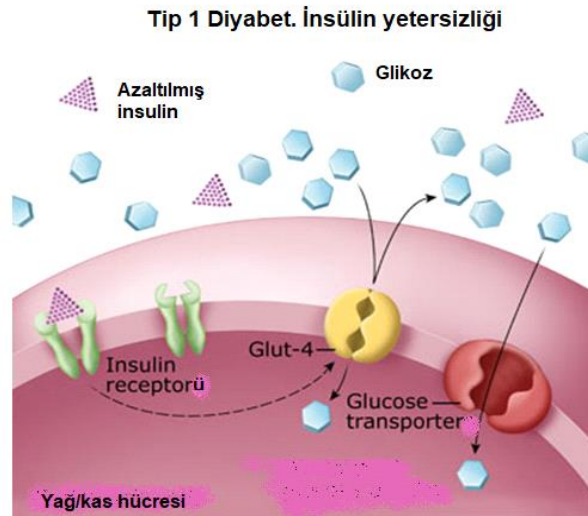
Türkiye'de diyabetli insanların sayısı 1998 yılında 2,5 milyondan 2013 yılında neredeyse 7 milyona yani üç kat artmıştır. Türkiye'de 1998 ve 2010 yılında yapılan toplum tabanlı araştırmalarına göre, diyabet yaygınlığı erişkinlerde yaklaşık% 90 artarak yükselmeye devam etmektedir. Türkiye'de diyabetli kişilerin çok sayıda olması nedeniyle, Avrupa'da diyabetli hastaların \approx % 13'ünü oluşturmaktadır. İlaveten, Türkiye'de 3,7 milyon kişi tip 2 diyabet adayı olup glikoz toleransına sahiptir (International Diabetes Federation -IDF 2013).

1.2.1. Diyabetin Sınıflandırılması

Diyabet için 2018 yılında Amerikan Diyabet Birliği'nin yaptığı sınıflandırmaya göre; Tip 1, Tip 2, Gestasyonel ve diğer nedenlere bağlı olarak spesifik diyabet tipleri olmak üzere 4 ana gruba ayrılmıştır (American Diabetes Association 2. 2018).

1.2.1.1. Tip 1 DM (İnsüline Bağımlı Diyabet)

Pankreastaki Langerhans adacıklarında insülin salgılayan beta hücrelerinin kaybı sonucu oluşan tam insülin eksikliği ile karakterize olup güçlü inflamatuar etkiye sahip kronik bir otoimmün hastalıktır (Eizirik ve diğ. 2009 ve Çizim1.10).



Çizim 1.10. Tip 1 Diyabetes Mellitus'ta İnsülin yetersizliği (What is Type 1 Diabetes?).

Daha önce “insüline bağımlı diyabet” veya “genç başlangıçlı diyabet” olarak adlandırılan bu form diyabetin % 5-10'unu oluşturur ve pankreatik β hücrelerinin hücrel aracı otoimmün yıkımından kaynaklanır (American Diabetes Association 2. 2018, Sperling 2000, Alemzadeh 2004).

Otoimmün belirteçler, adacık hücresi otoantikorları ve GAD (GAD65), insülin, tirozin fosfatazlar IA-2 ve IA-2b ve ZnT8'e karşı otoantikorları içerir. Tip 1 diyabet, bu otoimmün belirteçlerin bir veya daha fazlasının varlığı ile tanımlanır (American Diabetes Association 2. 2018).

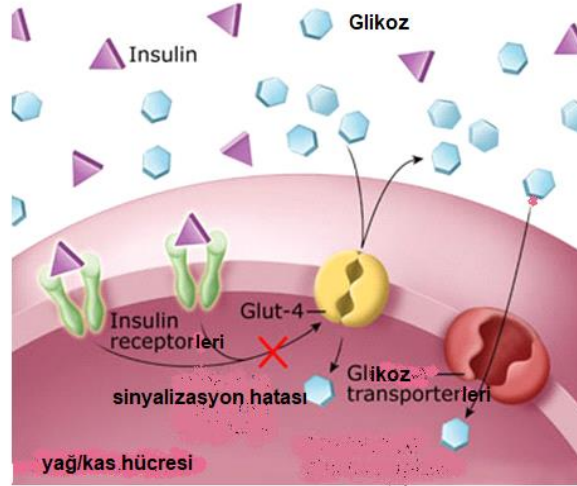
Hastalarda, hiperglisemiye bağılı ozmotik diürez sonucu idrara çıkma artmıştır. İdrarda glikozun yanı sıra su ve elektrolit kaybı da vardır. Hiperozmolar durum nedeniyle susama hissi mevcuttur. Normal ya da artmış iştaha rağmen ortaya çıkan kilo kaybı subakut gelişen hastalıkta sık görülür. Kilo kaybı başlangıçta su, glikojen ve trigliserid azalmasına bağılyken daha sonra aminoasitlerden glikoz ve keton cisimcikleri yapılması sonucu kas kaybı da olaya eklenir. Total potasyum kaybı ve kas protein katabolizması nedeniyle güçsüzlük ortaya çıkar. Periferik sinirlerin geçici disfonksiyonuna bağılı pareteziler gözlenebilir (Candan 2003).

İdiopatik tip 1 Diabet. Tip 1 diyabetin bazı formları bilinen bir etyolojiye sahip değildir. Bu hastalar kalıcı insülinopeni var, fakat beta hücresi otoimmünitesi için bir kanıt yoktur. Tip 1 diyabetli hastaların küçük bir kısmı bu kategoriye girse de, bunların çoğu, Afrikalı ya da Asya kökenli olmaktadır. Bu diyabet formu güçlü bir şekilde kalıtsaldır ve HLA ile ilişkili değildir (American Diabetes Association 2. 2018).

1.2.1.2. Tip 2 DM (İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet)

Daha önce “İnsüline bağımlı olmayan diyabet” veya “erişkin başlangıçlı diyabet” olarak adlandırılan tip 2 diyabet, tüm diyabetlerin % 90-95'ini oluşturur. Bu form, relativ (mutlak değil) insülin eksikliğe ve periferik insülin direncine sahip hastaları kapsar (Çizim1.11). En azından başlangıçta ve genelde yaşam boyunca, bu hastalar hayatta kalmak için insülin tedavisine ihtiyaç duymayabilir (American Diabetes Association 2. 2018).

Tip 2 Diyabet. İnsulin rezıstans



Çizim 1.11. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta İnsülin direnci ve GLUT 4'ün etkisi (What is Type 2 Diabetes?)

Tip 2 diyabetin çeşitli nedenleri vardır. Spesifik etiyojiler bilinmese de, β hücrelerinin otoimmün yıkımı görülüyor. Tip 2 diyabetli hastaların çoğu fazla kilolu veya obezdir. Tip 2 diyabet sıklıkla uzun yıllar tanı konulmadan gider, çünkü hiperglisemi yavaş yavaş geliyor ve erken aşamalarda, hastanın klasik diyabet semptomlarını fark edebilmesi için yeterince şiddetli değildir. Yine de, tanı konmamış hastalar bile makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların gelişme riskini artırmaktadır (American Diabetes Association 2. 2018).

1.2.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

GDM, hamileliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde ilk tanı konulan diyabettir ve önceden var olan tip 1 mi ya da tip 2 diyabet mi açık değildir. GDM doğumdan sonra tip 2 diyabet gelişimi için artmış risk sunmaktadır (Noctor ve diğ. 2016, Kim ve diğ. 2002) ve etkili önleme müdahaleleri mevcut olduğu için (Ratner ve diğ. 2008, Aroda ve diğ. 2015), GDM tanısı konan kadınlara, prediyabet ve tip 2 diyabet için ömür boyu tarama yapılmalıdır.

1.2.1.4. Diğer Nedenlere Bağlı Olarak Spesifik Diyabet Tipleri: Monogenik diyabet sendromları: Neonatal Diyabet, Gençlerin Erişkin Tipi Diyabeti (Maturity-Onset Diabetes of the Young-MODY); ekzokrin pankreas hastalıkları: Kistik Fibrozisla ilgili diyabet ve

ilaç veya kimyasal kaynaklı diyabet: glukokortikoid kullanımı, HIV/AIDS tedavisinde veya organ nakli sonrası diyabet.

1.2.2. Diyabetin Komplikasyonları

Tedavi altında olsun veya olmasın tüm diyabet hastalarında kan şekeri (plazma glikoz) düzeylerinin kontrol altında olmadığı durumlarda kısa (akut) ve uzun (kronik) dönemde çeşitli sistem, organ veya doku hasarları ortaya çıkabilir.

Hipoglisemi (düşük kan şekeri), ketoasidoz (diyabetik koma), laktik asidoz, bakteri/mantar enfeksiyonları, hiperglisemik nonketotik koma diyabetin akut komplikasyonlarıdır. Kronik komplikasyonlar arasında ise, mikrovasküler hasarın en sık görüldüğü; retinopati (gözlerin hasar görmesi), nöropati (sinirlerin hasar görmesi), nefropati (böbreklerin hasar görmesi) ve makrovasküler hasarın en sık görüldüğü; hızlanmış damar sertliği, diyabetik ayak, koroner arter hastalığı ve impotens vardır. Bu komplikasyonlar hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetlilerde ortaya çıkabilir. Özellikle kronik olanlar yıllar boyunca belirti vermeden ilerleyebilir.

Sık görülen diyabet komplikasyonlarından diyabette mantar enfeksiyonları, diyabetik ayak, diyabetik nöropati ve diyabetik nefropatidir (Uludağ 2010).

1.2.3. Diyabet Tanı ve Tedavisi

American Diabetes Association (ADA) tarafından hazırlanan “Standards of Medical Care in Diabetes-2018”e göre, diyabetin teşhis metodu bulunmaktadır. İlk olarak plazma glikoz; açlık kan şekeri >126 mg / dL (7.0 mmol / L) ve açlık süresi ise 8 saat olması gerekmektedir. Bunun yanında 75 g oral glikoz tolerans testi (OGTT) sırasında 2 saatlik plazma glikozun (2-sa PG) değeri: OGTT sırasında 2-sa PG >200 mg/dL (11.1mmol/L) ya da A1C kriterleri: A1C $> 6.5\%$ (48 mmol/mol). Aynı testler diyabeti taramak ve prediyabetli olanlarda da tespit etmek için kullanılabilir.

Tip 1 diyabetli çoğu kişide, günlük prandial (hızlı etkili veya öğün zamanı) insülin ve bazal insülin enjeksiyonları veya sürekli subkutan insülin infüzyonu ile tedavi edilmelidir. Tip 1 diyabetli bireylerin çoğunda hipoglisemi riskini azaltmak için hızlı etkili insülin analogları kullanılmalıdır. Tip 1 diyabetli hastaları prandial insülin dozları ile karbonhidrat alımına, yemek öncesi kan şekeri düzeylerine ve beklenen fiziksel aktiviteye göre uygun almak için eğitim verilmesi gerekmektedir (American Diabetes Association 8. 2018).

Metformin, kontrendike değilse ve tolere ediliyorsa, tip 2 diyabetin tedavisi için tercih edilen ilk farmakolojik ajandır. Metformini uzun süreli kullanımında, B12 vitamini eksikliği ile ilişkili olabilir ve özellikle anemi veya periferik nöropati olanlarda metformin

ile tedavi edilen hastalarda vitamin B12 düzeylerinin periyodik ölçümü yapılmaktadır. Semptomatik olan ve/veya A1C > 10% (86 mmol / mol) ve/veya kan Glikoz seviyeleri 300 mg/dL (16.7 mmol/L) olan yeni tanı konulmuş tip 2 diyabetli hastalarda insülin tedavisini başlatmayı germektedir. Tip 2 diyabet ve aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan kişiler yaşam tarzını değiştirerek metformin ilacı iletdevi olunuyorlar. Fakat majör kardiyovasküler olayları azaltmak için antihiperglisemik ajan kanagliflozinin hastaya özgü olarak eklenmesi germektedir (American Diabetes Association 8. 2018).

1.2.4. Deneysel Diyabet Modelleri

Tip 1 diyabet modelleri; ilaç kullanarak oluşturulan tip 1 diyabet modelleri (Alloksan, Streptozotosin), virüsle oluşturulan modeller, transgenik tip 1 diyabet modelleri olarak gruplandırılabilir ve spontan tip-1 diyabet modelleri (Çin hamsteri, Bio-Breeding rat, Keeshand köpeği, NOD fare, Macaca nigra maymunu, Yeni Zelanda beyaz tavşanı, Komodo Diabetes Prone rat) bunlardır. Tip 2 diyabet modelleri ise; yüksek seviyede hiperglisemili modeller (db/db fare, Rhesus maymunu), orta seviyede hiperglisemili modeller (ob/ob fare), deneysel modeller (pankreatektomi, hipotalamik lezyon) ve diyet ile oluşturulan modeller (yüksek yağlı ve şekerli diyetle beslenme) olarak sayılabilir (İrer ve Alper 2004).

Tip-1 diyabet modeli en yaygın kullanılan Streptozotosin (STZ) intraperitoneal (i.p) tek bir yüksek doz ve i.p çoklu düşük doz enjeksiyonlar olan 2 protokolü mevcuttur. Tek dozlu rejim yoluyla diyabet indüksiyonu için bildirilen dozlar 100 mg/kg ile 220 mg/kg arasında değişir. Düşük dozlu protokolda ise ardışık 5 gün 40 mg/kg STZ i.p olarak uygulanması önerilmektedir (Rees ve Alcolado 2005). Sıçanlarda diyabet oluşturmak için en çok kullanılan doz i.p. olarak 60-80 mg/kg'dır. Ancak daha yüksek dozlar da kullanılabilir. Erişkin sıçanlara düşük dozda STZ multipl dozda (40 mg/kg, 5 gün) verilirse inflamasyonla giden otoimmün tip 1 diyabet modeli oluşturulabilir. Tek doz 60-100 mg/kg STZ verilen diyabet modeli otoimmün profil oluşturmaz (Erbaş 2015).

Deneysel hayvan modelleri, patolojiye genetik olarak uygun türlerin seçilebilmesine; istatistiksel değerlendirmeye yetecek kadar çok sayıda örnekle çalışılabilmesine ve değişkenlerin kontrol altında tutulmasına; birden fazla risk ve patolojinin çalışılabilmesine; tanı koydurucu, koruyucu veya terapötik yaklaşımların denenmesine olanak vermektedir. Bununla birlikte hayvanlarda oluşturulan diyabet modellerinin hiçbiri insan diyabetine tam olarak eşdeğer tutulamaz (İrer ve Alper 2004).

1.2.4.1. Streptozotosin (STZ)

Streptomyces achromogenes türü bakterilerden veya sentetik yollarla elde edilen Streptozotocin (2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose, önceleri dar spektrumlu bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (Çizim 9). Rakieten ve arkadaşları tarafından (Vavra ve diğ. 1959, Rakieten ve diğ. 1963) diyabetojenik etkisi olduğunu tespit edilmiş ve deneysel diyabet modeli oluşturmak için kullanılmaya başlanmıştır. STZ, diyabette pankreatik beta hücrelerinin toksisitesini araştırırken kullanılan en belirgin diyabetojenik, antibiyotik ve antikanser ajanıdır (Gauthier 2014).

STZ'nin hedefi pankreatik beta hücrelerindeki DNA'dır. STZ'in hücre içinde nitrozure gruplarının dekompozisyonu ile oluşan reaktif karbonyum iyonları DNA bazlarında alkilasyona neden olarak hızlı ve irreversibl nekroz ile sonuçlanır (Nakagami ve diğ. 2005).

1.2.5. Diabetes Mellitus ve Dişi Genital Sistemi

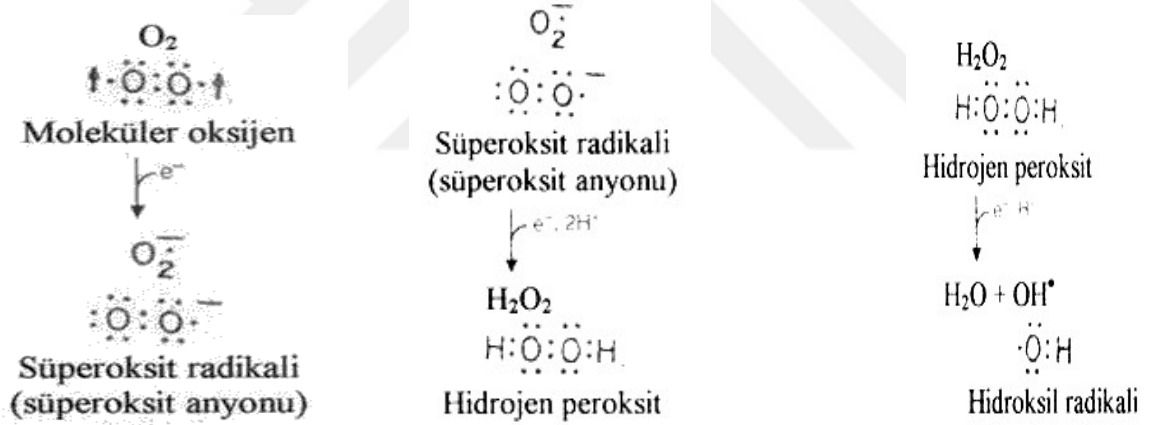
Diabetes mellitus, kan şekeri yüksekliği yanında, özel komplikasyonlara yol açan bir hastalıktır (Öbek 1990). Yapılan çeşitli çalışmalarda; diyabete bağlı östrojen (Cox ve diğ. 1994), progesteron (Tesone ve diğ. 1983), LH ve FSH düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Bestetti ve diğ. 1987). Yüksek glikoz düzeyinin rat granüloza hücrelerinde östrojen ve progesteron düzeyini azalttığı (Chabrolle ve diğ. 2008) ve DM'li kadınlarda menarşda gecikme ve menstrual düzensizliklerin yaygınlığı, aynı yaştaki nondiyabetik kadınlardan daha fazla görülmüştür (Yeshaya ve diğ. 1995). Lin ve arkadaşları, fare ovaryumlarının kesitlerinde diyabete bağlı oosit gelişiminde gecikmenin olduğu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada; aneksin V, Bax ve kaspaz-3 eksprese eden oosit miktarında yükselme saptanmışlardır ve diyabetin oositte apoptosis'ı arttırdığı kanıtlanmışlardır (Lin ve diğ. 2010). Diyabetli kadınlarda PCOS prevalansının daha yüksek, hirsutizm'in daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir (Tok ve diğ. 2004). Diyabetin ovulasyon oranını azalttığı, oositteki mayotik iğ defektlerini ve anöploidi'yi arttırdığı vurgulanmıştır (Cheng ve diğ. 2011). Diyabet kumulusla çevrili oositlerde konneksin ekspresyonunun ve gap junction iletişiminin azaldığı, bu durumun bozulmuş oosit mayotik olgunlaşması ve zayıf gebelik sonucundan sorumlu olabileceği ifade edilmiştir (Ratchford ve diğ. 2008).

1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron

serbest radikale büyük bir reaktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Bansal ve Bilaspuri 2010).

Yani aerobik ortamda serbest radikallerin çoğu oksijen radikali halindedir (Hensley ve diğ.2000). Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulduklarından dolayı diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler. Elektronlarını çiftler halinde (eşlenik) bulduran atomlar veya moleküller ise kararlı bir yapıya sahip olduklarından, başka moleküller ile reaksiyonlara girme eğilimleri serbest radikaller kadar yüksek değildir. Bu yüzden kararlı yapıda bulunan, eşlenmemiş elektronu bulunmayan ve diğer maddeler ile radikallerden daha zayıf bir şekilde reaksiyona giren moleküller nonradikaller olarak tanımlanır (Halliwell 1999; Valko ve diğ. 2007). Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir. Oksijen kaynaklı olanlar Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijen molekülü içeren kimyasal reaktif moleküller olup radikal olan hidroksil iyon (OH), süperoksit iyon (O_2^-), nitrik oksit iyon (NO) ve radikal olmayan ozon (O_3), oksijen (O_2), lipid peroksit (LOO), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi molekülleri temsil eder (Agarwal and Said 2005).



Çizim 1.12. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Süperoksit Radikali (O_2^-)

Süperoksit radikali, serbest radikal olmasına rağmen yüksek derecede reaktif değildir (Cadenas ve Sies, 1998). Normalde oksijenin suya dönüştürülmesi gerekirken, toplam elektronların % 1-3'ü O_2^- oluşturmak üzere sızdığı submitokondriyel parçacıklar üzerindeki ölçümlerde gösterilmektedir. Süperoksit radikali, elektron transport sisteminde hem kompleks I hem de kompleks III'te üretilir ve anyonik forma dönüştüğünde mitokondrinin iç membranından kolaylıkla geçer. Kompleks I'e bağlı O_2^- özellikle

matriksin içine bırakılır ve sağlam mitokondriden herhangi bir kaçak ortaya çıkamaz (Muller ve diğ. 2004).

Hidrojen Peroksit Radikali (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmamasına rağmen yine de çok önemlidir. Çünkü biyolojik membranlara nüfuz edebilir. Hidrojen peroksit, nötrofillerin fagozomlarında bulunan bir enzim olan miyeloperoksidaz tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür. Bu sırada geçiş metallere oksidasyonu yoluyla da O⁻ oluşmasına neden olarak ROT moleküllerinin üretilmesinde bir aracı olarak rol oynar. Hidrojen peroksidin bir diğer önemli fonksiyonu da hücre içi sinyal molekülü rolünü yerine getirmektir (Rhee 1999). Hidrojen peroksit'in önemli ölçüde hücre ölümünü indüklediği ve hücre içi ROT düzeyini, lipid peroksidasyonu ve DNA fragmentasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Kim ve diğ. 2013).

Hidroksil Radikali (- OH)

Hidroksil radikali, biyomoleküller ile daha güçlü reaksiyona girmesinden dolayı biyolojik sistemlere diğer ROS'lardan daha fazla zarar verebilir. Oksidatif strese en olası toksik reaktan olarak görülmektedir (Betteridge 2000). En kısa ömürlü ve en reaktif radikal olarak özellikle yakın çevresindeki dokularda büyük hasara sebep olur (Das 2000).

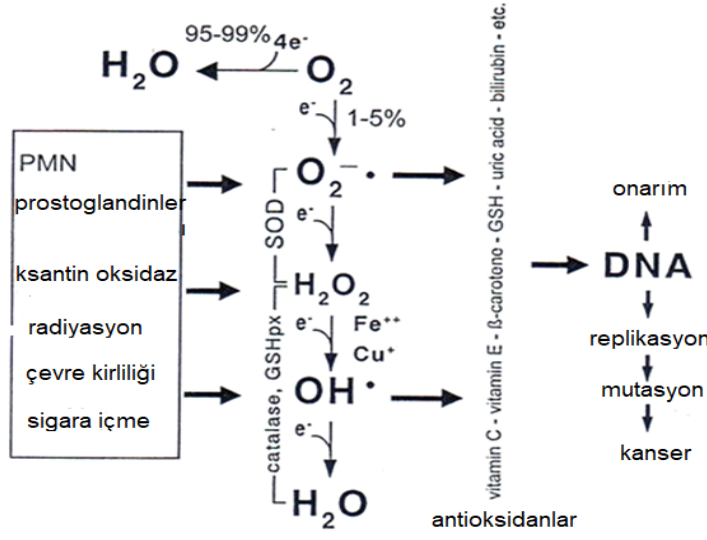
Nitrik Oksit Radikali (NO)

Nitrik oksit radikali oldukça reaktif bir molekül olup yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilir. Endotel hücresi, sinir hücresi, düz kas hücresi, makrofaj ve trombosit gibi çeşitli hücrelerde, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla sentezlenebilir. Düşük dozda bulunması yararlı iken yüksek dozu zararlı olmaktadır (Das 2000).

1.3.1. Antioksidan Sistemler

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar olarak bilinmektedirler. Antioksidanlar; ROT'ni tutarak, onları çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, onlarla etkileşip bir hidrojen aktarım aktivitelerini azaltarak veya inaktif şekle dönüştürerek yada radikalleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak etki göstermektedirler. Endojen ve ekzojen antioksidanlar

olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endojen antioksidanlar, biyolojik moleküllerin oksidasyonunu engelleyen enzimatik antioksidanları içerir. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) dır (Çizim1.14). Listelenen bu enzimler birlikte çalışarak O_2 and H_2O_2 'yi daha zararsız olan H_2O_2 ve O_2 'ye çevirirler. Ekzojen antioksidanlar ise çoğunlukla meyve ve sebzelerde bulunup vücuda dışarıdan alınırlar (Agarwal ve Said 2005, Akkuş 1995).



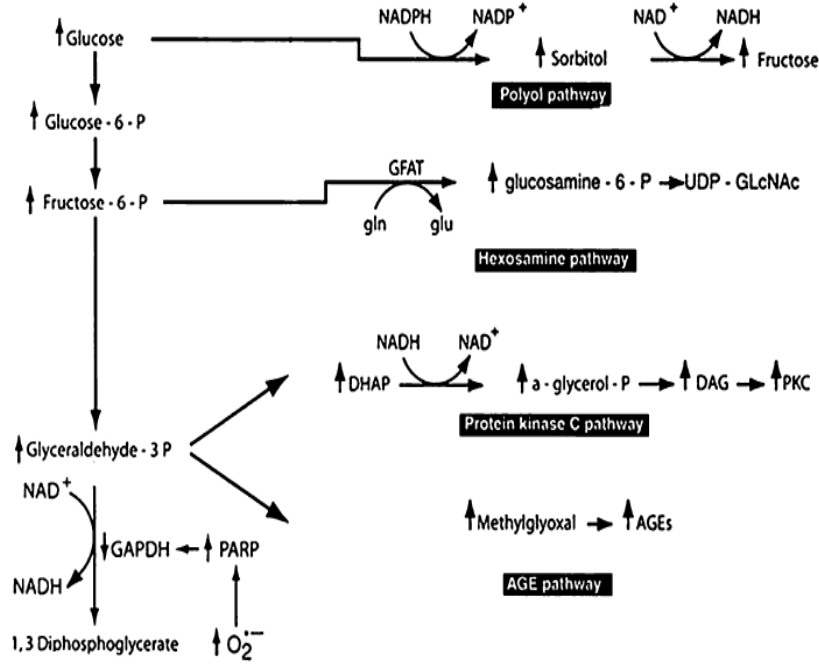
Çizim 1.13. Antioksidan sisteminin şematik görüntüsü.

1.3.2. Diyabete Bağlı Oksidatif Stres

Hiperглиsemi, doku hasarını 5 major mekanizma ile gerçekleştirmektedir (Çizim1.15.).

Bunlar:

- Poliol yolu üzerinden glikoz ve diğer şekerlerin artmış çözülmesi;
- İleri glikasyon ürünlerinin (AGE - advanced glycation end products) intrasellüler artışı,
- AGE ve onun aktive ligandları için artmış reseptör ekspresyonu;
- Protein kinaz-C izoformlarının aktivasyonu ve
- Heksozamin yolunun aşırı aktivasyonudur.



Çizim 1.14. Hiperglisemi doku hasar mekanizmaları.

Mitokondriyal aktivatörler tarafından süperoksidin aşırı üretimi GAPDH'yi inhibe ederek beş ana hiperglisemik hasar yolu (Brownlee, 2001 ve 2005; D'Souza et al, 2009)'ın dan. Yukarı akışlı glikolitik metabolit gliseraldehid-3-fosfat, metilglioksal ve diasilgliserolün öncüsüdür. Bu nedenle, artan seviyeler, sırasıyla AGE yolunu ve PKC yolağını aktive eder. Daha ileri akışta, glikolitik metabolit fruktoz-6-fosfat artar, bu da heksosamin yolundan akış artar. Son olarak, GAPDH inhibisyonunun, hücre içi glikozu ve akışı poliöl yolundan arttırdığı da bulunmuştur. Tersine, 4 yolun her biri tek tek ROT seviyelerini arttırmak için hareket ettiğinden, oksidatif strese ortak bir paydaya sahiptir.

Bu beş yolağın, hiperglisemi tarafından tetiklenen bir ortak yolak ile bağlantılıdır. Brownlee ve arkadaşları, yüksek glikoz koşulları altında, mitokondri tarafından fazla üretilen ROT'un, oksidatif strese yol açtığını göstererek bu alandaki araştırmaya öncülük etmişlerdir (Brownlee 2001). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda ROT'un ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Brownlee 2005). Sonuç olarak: DM karbonhidrat, yağ, protein metabolizması bozukluklarıyla ortaya çıkan kronik metabolik bir hastalık olmakla beraber aynı zamanda nonenzimatik glikozilasyon, sorbitol yol aktivitesi, heksozamin yolu aktivitesi, oksidatif glikozilasyon, protein kinaz C aktivitesi ve enerji metabolizmasındaki değişiklikler ile

artmış bir oksidatif stres durumudur (Vincent ve diğ. 2004). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; tip II diyabet hastalarının oksidatif strese duyarlı oldukları, yüksek kan glikoz düzeyinin serbest radikallerin aracılık ettiği lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğuna işaret edilmiştir (Likidilid ve diğ. 2010). İnsüline bağımlı genç diyabet hastalarında ise antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz'ın plazma düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ayrıca lipid peroksidasyon belirteci olan MDA'nın plazma düzeyinin ise arttığı saptanmıştır (Indran ve diğ. 2004).

Çeşitli hayvan deneylerinde malondialdehid düzeyini önemli ölçüde arttırdığı (Morakinyo ve diğ. 2013), kan hücreleri ve böbrek dokusu metabolizmasında aerobik ATP sentezinin baskılanması, laktat birikimi ve laktik asidoz gelişimi gibi dramatik değişiklikleri oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, diyabetin membran lipidlerinde tekrar yapılanmaya, mikrovizkositede değişikliklere yol açtığı, insülin reseptörlerini ve membrana bağlı Na (+), K (+)-ATPase ve Ca(2+)-ATPase'ı baskıladığı bildirilmiştir (Mikaelian ve diğ. 2013).

Oksidatif stresin diyabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesinde oldukça önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak eksojen olarak verilen antioksidanların bu komplikasyonların hafifletilmesinde ve/veya ortaya çıkmasının engellenmesinde yararlı olabileceği fikri ileri sürülmüş olup diyabet tedavisinde antidiyabetiklere ek olarak antioksidan maddelerin veya antioksidan özellikleri olan ajanların kullanılmasının oksidatif stresle başa çıkabilmek için gerekli olabileceği yönünde kanaat oluşmuştur (Brownlee 1995).

1.3.3. Apoptoz

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler, 1920 yılında ışık mikroskobunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk nekroz tanımlanmıştır. Kerr ve arkadaşları 1972 yılında, nekrozdaki farklı oluşan bir hücre ölümü göstermiş ve buna eski Yunanca'da sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen "apoptoz" adı verilmiştir. Apoptoz terimi, o zamandan günümüze kullanılmakta ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü ifade etmektedir. Apoptoz gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır. (Öktem ve diğ. 2001, Altunkaynak ve

diğ. 2008). Apoptotik hücre ölümü ve yenilenmesinin günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı, yetişkin bir insanın vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelmektedir (Ulukaya 2018). Memeli ovaryumunda foliküllerin ortaya çıkma işlemi, foliküler dalgalanma süreci içerisinde proliferasyon, farklılaşma ve atrezi arasında kompleks bir etkileşim sonucunda meydana gelir. Folikül atrezisi olarak bilinen bu işlem apoptozdur ve folikül hücrelerinin ölümü genetik olarak belirlenmiştir (Mayes 2002, Zeuner ve diğ. 2003).

1.4. Statinler

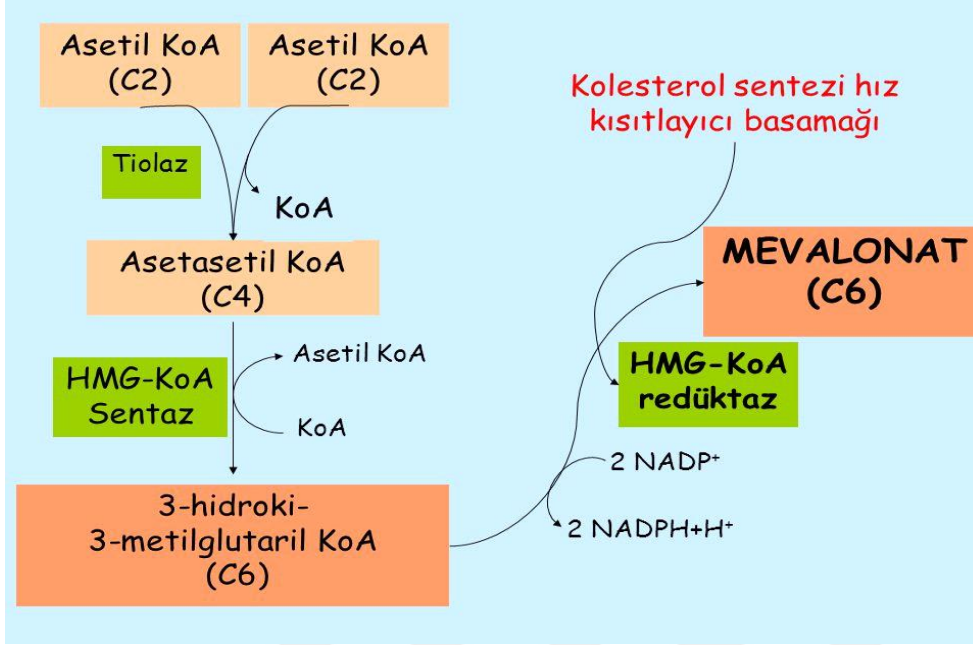
Statinler ilk olarak bir küf olan *Penicillium citrinium*' dan izole edilmişler ve 1976'da Endo ve meslektaşları tarafından kolesterol sentezi inhibitörü olarak tanımlanmışlardır (Endo ve diğ. 1976). Ardından Brown ve arkadaşları tarafından (1978) statinlerin hidrosimetilglutaril koenzim A (HMGCoA) redüktaz enzimini inhibe ederek etki ettiği bildirmişlerdir (Brown ve diğ. 1978). Alberts ve arkadaşları insanda kullanımı uygun görülen ilk statin lovastatini geliştirmişlerdir ve *Aspergillus terreus*'dan izole etmişlerdir (Alberts ve diğ. 1980). Lovastatinin FDA (Food and Drug Administration) tarafından kabul edilmesinden sonra, şimdiye kadar yedi statin daha geliştirilmiştir. Bunlardan fungal kaynaklı HMGCoA redüktaz inhibitörleri: lovastatin, simvastatin ve pravastatin ve sentetik bileşikler olanlar: atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin, pitvastatin ve rosuvastatin (Davidson 2002).

1970'lerden beri şu ana kadar en yaygın reçete edilen ilaçlardır (Whayne 2011). Genellikle güvenli ve iyi tolere edilen olarak kabul edilmektedir. Statinler, günümüzde primer ve sekonder korumada en sık kullanılan ve kardiyovasküler hastalığı önleyici veya risk düşürücü etkileri çok sayıda çalışmada gösterilmiş olan, en güçlü ilaçlardır (Takemoto ve Liao 2001).

1.4.1. Atorvastatin'in Etki Mekanizmaları

Statinler, kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan 3-hidroksi-3-metilglutarilkoenzim A (HMG CoA) redüktaz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek, mevalonat yolu ile kolesterol sentezini (Çizim1.16) engeller (Takemoto ve Liao 2001). Bu enzimin statinler tarafından yarışmalı inhibisyonu hepatositlerde kolesterol sentezini baskılar. Hücre içindeki kolesterol miktarının azalması hepatosit yüzeyinde LDL reseptörü ekspresyonunu artırır. Sonuçta dolaşımdan daha fazla LDL kolesterol çekilir ve

dolaşımdaki LDL konsantrasyonu azalır (Hobbs ve diğ. 1992). Plazma total kolesterol, LDL-k, apo-B ve TG'lerin düzeyini düşürürken, HDL-k düzeyini yükseltirler (Takemoto ve Liao 2001).



Çizim 1.15. Statinlerin kolesterol sentezine etkisi.

1.4.2. Statinlerin Yan Etkileri:

HMG-CoA redüktaz inhibitörleri yan etkilerinin diğer lipid düşürücülere göre genellikle iyi tolere edilen, güvenli ilaçlardır. En sık görülen yan etkileri bulantı, kusma, diyare gibi gastrointestinal bozukluklar ile başağrısı, döküntü ve periferik nöropatidir. Klinik açıdan en önemli yan etkileri ise hepatotoksisite, rabdomiyoliz ve ilaç etkileşimleridir (Hsu ve diğ. 1995). Statin kullanımıyla ilişkili, klinik anlamı olan tek büyük yan etki miyopatidir. Bütün statinler miyopatiye ve rabdomiyolize yol açabilir (Physicians' Desk Reference 2001). Miyopati riskini artıran ek bir ilaç uygulanmayan hastalarda, miyopati riski düşüktür (< % 0.1). Fibrat grubu ilaçlar ve niasin tek başlarına kullanıldıklarında da miyopatiye sebep olabilmektedirler. Statinler, fibratlar veya niasin ile birlikte uygulandığında, muhtemelen iskelet kaslarında sterol sentezinin aşırı baskılanması sebebiyle miyopati gelişir (farmakodinamik etkileşim) (Christians 1998).

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda diyabetik olmayan statin tedavisi gören hastalarda yeni gelişen diyabet (new onset diabetes) olduğu gözlenmiştir. Statinlerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine bağlı olarak çeşitli moleküler mekanizmalarla insulin sekresyonunu ve glikoz geri alımını, dolayısıyla glisemik kontrolü olumsuz şekilde

etkilediği düşünülmektedir. Bunun yanısıra statin tedavisi gerektiren hastalıkların kompleks yapısından dolayı statinlerle birlikte kullanılan β -blokörler, tiazid diüretikler ve glukokortikoidlerin de diyabet riskini artırabileceği rapor edilmiştir. Ancak diyabette kardiyovasküler hastalık riskini azaltmada oldukça etkili olması nedeniyle risk-yarar ilişkisine bakılarak kullanılması önerilmektedir (Bang ve Okin 2014, Barylski ve diğ. 2014, Ruscica ve diğ. 2014).

1.4.3. Statinlerin Pleiotropik Etkileri

Statinlerin bugün için bilinen pleiotropik etkileri; endotel fonksiyonunu düzeltmesi, NO biyoyararlanımını arttırması, aterosklerotik plakların stabilizasyonu, vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe etmesi, trombosit agregasyonunu ve vasküler inflamasyonu azaltması ve antioksidan özellik göstermesidir. Apoptotik, immunosupresif ve onkoprotektif etki, osteoporoz, kronik böbrek hastalığı ve albuminüri üzerine etkileri gibi pek çok yararlı etkisi literatürde bahsi geçen pleiotropik etkileri arasındadır (Almong 2004, Kwak ve diğ. 2003).

Endotel Fonksiyonunu ve nitrik oksit üzerine etkileri: Statinler plazmada LDL düzeylerini düşürmek ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeylerini arttırmak suretiyle endotel fonksiyonunu düzeltebilir. Statinler, ayrıca endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini arttırarak ya da oksidatif stresi azaltarak, NO biyoyararlanımını arttırmakta ve endotel fonksiyonunu bozan hipoksi ve okside-LDL bulunan ortamlarda da eNOS aktivitesini düzeltmektedirler (Bonetti 2003). Statinlerin endotel fonksiyonu düzeltici etkilerinin oluşmasında rol aldığı başka bir mekanizma antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Statinler, endotel kaynaklı gevşemeleri, süperoksid ve hidroksil radikalleri gibi, ROT oluşumunu inhibe ederek arttırır; bununla birlikte, lipid düşürücü etkileriyle vasküler oksidatif stresi zaten azaltmaktadırlar (Jones ve diğ. 2003).

Antitrombotik etkisi: Statinlerin çeşitli çalışmalarda artan trombosit aktivitesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Statinlerin bu etkisinde tromboksan A2 ve trombosit membranındaki kolesterol içeriğinin düzenlenmesi önemli rol oynamaktadır. Hayvan çalışmalarında, statin tedavisi ile hasarlı damarlarda trombosit agregasyonunun inhibe olduğu ve trombus oluşumunun azaldığı da gösterilmiştir (Oto ve diğ. 2003, Aikawa ve diğ. 2001).

Antiinflamatuvar Etki: Yapılan alışmalar, statinlerin aterosklerotik plaklarda bulunan inflamatuvar huceleri azalttığı ve antiinflamatuvar etkileri olduğunu kanıtlanmıştır. Statin kullanımına bağlı olarak gelişen antiinflamatuvar etkinin oluşum mekanizmaları çok çeşitlidir. Bunlar arasında; endotelin-1, interloklin-6, vaskuler huce adezyon molekülü-1 (VCAM-1), intersellüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve platelet derived growth factor (PDGF), C- reaktif protein (CRP) düzeyinde ve proinflamatuvar sitokinlerde (IL-1β ve TNF-alfa) düzeylerinde azalma; nükleer faktör-κB (NF-κB) aktivasyonunda azalma, NO düzeyinde artma, endotelial huce aktivasyonunda, peroksizom proliferatör aktive reseptor-alfa (PPAR-α) düzeyinde artış, apolipoprotein A1 ekspresyonun uyarılması, LDL oksidasyonunun inhibisyonu ve bazofillerden histamin üretiminin inhibisyonu bulunmaktadır (Vaughan ve diğ. 2000, Chan ve diğ. 2004).

Antioksidan Etki: Statinler, süperoksit formasyonunda ve serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar (Wassmann ve diğ. 2001). Bu ilaçların sadece lipid düşürücü değil, aynı zamanda anti-inflamatuvar özellikleri ateroprotektif etkilerinden sorumlu olabileceğini gösteren kanıtlar vardır (Jukema 2004). Hiperkolesteromik sıçanlarda Atorvastatin'in oksidatif markırlar, nitrik oksit ve homosistein değişimini de azalttığı ve anjiotensin-II ile uyarılan vasküler remodelling ve oksidatif stresi önlediği bildirilmiştir (Briones 2009).

Antihipertansif Etki: Yapılan bir çalışmada sistolik hipertansiyonlu hastalarda Atorvastatin ile hem sistolik hem de diyastolik tansiyonun azaldığı saptanmış. Başka çalışmalarla da kolesterol düşüşünden bağımsız olarak kan basıncında azalmalar görülmüş (Kawano ve Yano 2006).

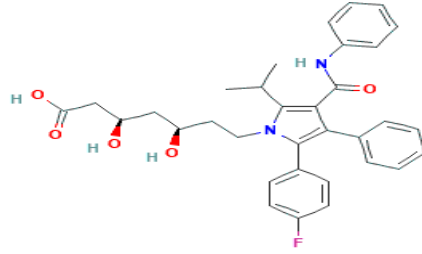
Antitümör (onkoprotektif) Etki: Yapılan huce kültürü çalışmalarında, kanser hucelerinde HMG-CoA enzim inhibisyonu ile Ras, Rho ve Rac gibi isoprenoid proteinler bloke olduğunda, huce büyümesinin ve diferansiyasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Demierre ve diğ. 2005). Statinler, Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK), fosfotidilinozitol 3 kinaz (PI3K), protein kinaz B (AKT), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi birçok önemli hucresel sinyal yolağını etkiler. Sonuç olarak statinler; proapoptotik, antianjiogenetik ve immunomodlatuar etkileri nedeniyle kanser hucresinde büyümeyi önlerler (Chan ve diğ. 2003).

1970'li yıllardan beri kullanılmakta olan statinler günümüzde en yaygın olarak kullanılan ilaçlar (Whayne 2011) olup, genellikle güvenli ve iyi tolere edildiği kabul edilmektedir.

Bununla birlikte, beş den fazla büyük randomize plasebo-kontrol çalışmasının araştırmacıları, bu tür ilaçları alan hastalarda diyabetin gelişimi ile ilgili sonuçları bildirmiştir (Sattar ve diğ. 2010, Preiss ve diğ. 2011).

1.4.4. Atorvastatin

Atorvastatin ikinci kuşak statin grubundan olup lipid düşürücü etkisini 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A, HMG-CoA)'yı inhibe ederek göstermektedir (Çizim1.17).



Çizim 1.16. Atorvastatinin kimyasal yapısı (PubChem [CID:60823](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atorvastatin)).

IUPAC: (3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-propan-2-il pirol-1- il]-3,5-dihidroksiheptanoik asit.

HMG-CoA'nın yapısal analogu olan statinler HMG-CoA redüktaza 1000-10000 kat fazla affiniteleri sayesinde enzimi kompetitif ve reversibl inhibe ederek kolesterol sentezini inhibe ederler. İndirekt olarak da LDL-reseptörlerinin up-regülasyonu ile plazma kolesterol seviyesini azaltırlar (Kapur ve Musurunu, 2008).

Atorvastatin'nin diğer statinlerden farklı olarak trigliserit seviyesindeki azalmaya sebep olması iki olası mekanizmayla açıklanmaktadır; (1) trigliseritlerin vücutta taşınmasını sağlayan VLDL üretiminde gerekli olan kolesterol sentezinin inhibisyonu sonucu VLDL sekresyonundaki azalma, LDL reseptörünün ekspresyonunun artması sonucu VLDL ve LDL bağlanmasında artma (Bakker ve diğ. 1996, Lea ve McTavish, 1997).

2. AMAÇ

Bu çalışmada birinci amacımız deneysel diyabet modeli oluşturduğumuz sıçanların ovaryumlarında oluşan hasarı incelemektir, ve 2.amacımız ise Atorvastatin tedavisinin doku koruyucu etkilerini değerlendirmektir. STZ ile indüklenen diyabetin ovaryum dokusundaki yapısal değişimleri ışık mikroskopik düzeyde H&E ile boyanmış seri kesitlerde follikül sayımı ve rutin incelemeler yapılarak değerlendirildi. Ovaryum dokusunda hasarın değerlendirilmesi için TUNEL tekniği ile apoptoz, TGF- β ve VEGF immunohistokimya tekniği kullanılarak incelemeler yapıldı. STZ ile diyabetik hale getirilen ve farklı dozlarda Atorvastatin tedavisi alan gruplar karşılaştırıldı. İlâveten, plazmada ve ovaryum doku homojenatında oksidatif stres parametreleri ve diğer biyokimyasal ölçümler ile değerlendirme yapıldı. Leica marka kameralı mikroskop ile fotoğrafları çekildi. Elektron mikroskobu ile ovaryen dokuya ait hücre organelleri ve stroma ultrastrüktürel düzeyde incelenerek fotomikroğrafları alındı. Böylece diyabetin etkisi ve Atorvastatin'in bir antioksidan olarak diyabetik sıçan ovaryumlarını koruyup koruyamayacağı değerlendirildi.

3. YÖNTEM

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulundan 09 Temmuz 2015 karar tarihli ve KOU HADYEK: 7/12-2015 sayılı Etik Onay alındı, tüm deneyler etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen 66 adet, 180-200 gr ağırlığında, Wistar albino ırkı dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, uygun kafesler içerisinde barındırılarak serbestçe beslenip su içmeleri sağlandı. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca normal pelet yem ve su ile beslendi.

Sıçanlar başlangıçta kontrol ve deney grubu olarak ikiye ayrıldı;

Kontrol grupları

1) Kontrol grubu (Kontrol; n=11): Diyabet grubu sıçanlara STZ verildiği zamanda ve aynı çizimde tek doz kontrol grubuna sitrat tampon (0.1 M, pH 4.0, 1ml) i.p. olarak verildi (Erbaş ve diğ. 2013).

2) Atorvastatin'in doza bağımlı kontrol grupları (n=11+11=22)

a) Kontrol + 10 mg/kg/gün Atorvastatin [K-A(10)]: Oral gavage yolu ile sağlıklı normal hayvanlara, diyabetik hayvanlara uygulanan tedavi ile senkronize zamanlarda 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus ve diğ. 2014).

b) Kontrol + 20 mg/kg/gün Atorvastatin [K-A(20)]: Oral gavage yolu ile sağlıklı normal hayvanlara diyabetik hayvanlara uygulanan tedavi ile senkronize zamanlarda 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus ve diğ. 2014).

Deney grupları

3) Diyabet grubu (DM; n=11): STZ 60 mg/kg dozda (0.1 M, pH 4.0, 1 ml sitrat tampon içinde) i.p. tek doz olarak verildi (Erbaş ve diğ. 2013, Artunç-Ulkumen ve diğ. 2015).

4) Atorvastatin'in doz bağımlı tedavi grupları (n=11+11=22)

a) Diyabet + 10 mg/kg/gün Atorvastatin grubu [DM-A(10)]: Diyabetik sıçanlara oral gavage yolu ile Atorvastatin (10 mg/kg/day) 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus ve diğ. 2014).

b) Diyabet + 20 mg/kg/gün Atorvastatin grubu [DM-A(20)]: Diyabetik sıçanlara oral gavage yolu ile Atorvastatin (20 mg/kg/day) 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus ve diğ. 2014).

Deneylemiz (sitrat tampon, STZ enjeksiyon ve Atorvastatin ilaç tedavisi) 4 hafta sürdü. STZ verildikten bir hafta sonra hayvanların kan glikoz seviyeleri 2.kez kontrol edildikten sonra, Atorvastatin sıçanlara 3 hafta (21 gün) süre oral gavage yolu ile verildi, diyabetik olmayan sıçanlar deney dışı bırakıldı.

3.2. Sakrifikasyon

Deney süresinin sonunda her gruptaki tüm hayvanlar Alfazyne (2.5 mg/kg; i.p) ve Ketalar (12.5 mg/kg; i.p) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak (kardiyak ponksiyon) sakrifiye edildi ve batinları açılarak sağ ve sol ovaryumları alındı.

3.3.Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları haftada iki gün ve deney sonunda tartılarak kaydedildi.

3.4. Glikoz Seviyenin Ölçümü

Glikoz seviyesi, ilaç uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra ve sakrifiye etmeden önce ölçüldü. Kuyruk ucu kesilerek Optimum Xceed marka glüköz ölçücüye kan damlatıldı ve kan glikoz seviyeleri kaydedildi.

3.5. Biyokimyasal Analiz

Kalpten alınan kan örneklerinde KOÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında serum MDA, Glutation (GSH), TGF- β , İnsulin seviyeleri ile plazma AMH ve Pentraksin-3 seviyeleri belirlendi. Aynı şekilde ovaryum dokusunda da MDA ve GSH seviyeleri tespit edildi.

3.5.1.Doku Homojenizasyonu

Sıçan ovaryumlarında; protein tayini için dokular tartılarak üzerine 1/10 (ağırlık/volüm) oranında PBS (0.1 M/pH 7.4) eklenip doku homojenizatörü ile homojenize edildi (Calkins ve diğ. 2001). Homojenatlar 20 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı ve ependorflara alınarak -40°C'de analiz edileceği zamana kadar saklandı; analiz sırasında çözülerek çalışıldı.

3.5.1.1. Dokuda Protein Tayini

Total protein tayini Lowry modifiye metoduyla yapıldı (Hartree 1972). Analiz ettiğimiz parametrelerin (MDA ve GSH) doku sonuçları, doku protein miktarına oranlanarak elde edildi.

3.5.2. Kanda Triglisericid, Kolesterol, TGF- β , AMH, Pentraksin-3, İnsulin, MDA ve GSH Tayini

3.5.2.1. Triglisericid ve HDL Kolesterol Ölçümü ve Triglisericid ile HDL Kolesterol Oranı

Kardiyak ponksiyon ile alınan kan örnekleri pıhtılaşma amacıyla 10-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 2000-3000 RPM'de yaklaşık 20 dk sentrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatlice toplandı. Çıkarılan özüt (ekstrakt), -20°C 'de muhafaza edildi. Elde edilen serumda Triglisericid ve HDL Kolesterol seviyeleri rutin biyokimya otoanalizörü ile ölçüldü. Triglisericid ile HDL Kolesterol oranı otomatik online kalkulator kullanarak ölçüldü.

3.5.2.2. TGF- β , AMH, Pentraksin-3 ve İnsulin Ölçümü

Kandan elde edilen plazma örneklerinde TGF- β (R0084), AMH (R0640), Pentraksin-3 (R1002) ve İnsulin (R2466), ELISA kiti kullanılarak çalışıldı. Çalışma kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

3.5.2.3 Insulin Direnci Hesaplaması

Insulin direnci aşağıdaki förmülü kullanarak hesaplandı.

$\text{HOMA-IR} = [\text{Insulin}(\text{mIU/L}) \times \text{Glukoz}(\text{mmol/L})] / 405$ (Li ve diğ. 2014, Matthews ve diğ. 1985).

3.5.2.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 535 nm'de maksimum absorbanı veren pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülerek örnek içindeki MDA konsantrasyonu tayin edildi (Buege ve Aust 1978).

3.5.2.5. Glutation (GSH) Ölçümü

Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi: GPx aktivite tayin yönteminde, H_2O_2 varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) GPx tarafından okside glutatyon (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi

esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbandsdaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir. GPx aktivitesi kanda U/g Hb olarak tanımlanırken doku için U/g protein olarak ifade edilir. Bu yöntemin yapılışı kısaca; 50 mmol/L TRIS tamponunda (pH 7.6) hazırlanan 1 mmol/L Na₂ EDTA, 2 mmol/L indirgenmiş glutatyon, 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 U glutatyon redüktaz içeren bir karışımın 980 µl ile 20 µl eritrosit hemolizati veya doku homojenati karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılır. Reaksiyon, 8.8 mmol/L hidrojen peroksit eklenmesiyle başlatılır ve 3 dakika için 340 nm'de okunan absorbandsların azalışı kaydedilir (Pleban ve diğ. 1982).

3.6. Işık Mikroskopi Uygulamaları

Hayvanlardan alınan sol ovaryumlar ışık mikroskobik takip uygulamak üzere fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonuna konularak fikse edildi ve ardından yükselen dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dk süreyle tutuldu ve ksilen içinde 30 dk süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56°C'deki etüvde ilk olarak yumuşak daha sonra sert sıvı parafin içinde 45'er dk bekletilen parçalar parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her bir ovaryumdan 10 kesit aralıklarla alınan 10'ar kesit (sistemik örnekleme için)Hematoksilen–Eozin (H&E) ile boyandı; birer kesite de TGF-β ve VEGF immünohistokimya ve TUNEL tekniği uygulandı (Bolon ve diğ. 1997, Dorostghoal ve diğ. 2011).

3.6.1. H&E Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme

Parafin kesitler 2 saat süreyle 56°C'lik etüvde bekletildi, sonra 2 defa 20'şer dk. ksilende bekletilerek kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %70) geçirildi ve saf suya alındı. Ardından Mayer Hematoksilen'de 5 dk bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyanın giderilmesi için iki kere sudan geçirilen kesitler asit-alkole 10-15 saniye (sn) batırılıp çıkarılarak diferansiye edildi ve tekrar saf suya alındı. Daha sonra %100 etanolden hızlıca geçirilen kesitler sitoplazmik boyanma için Eozin Y solüsyonunda 2-3 dk tutuldu ve tekrar %100 etanole alındı. 3 kez %100 etanol serisinden geçen kesitler ksilolde ikişer kez 15'er dk bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.6.1.1. Folikül Sayımı

Her bir ovaryumdan 10 kesit aralıklarla alınan 10'ar kesit H&E ile boyandı ve folikül sayımı yapıldı (Dorostghoal ve diğ. 2011). Aynı foliküllerin tekrar sayılmasını engellemek için 5 seviyede bir alınan kesitlerde ayrı ayrı folikül sayımı yapıp toplandı ve total ovaryumdaki ortalama folikül sayısı hesaplandı. Foliküller; primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graaf folikül, korpus luteum ve atretik folikül olarak sınıflandı ve gruplar arasında folikül sayıları ile bu foliküllerin morfolojik özellikleri değerlendirildi (Du ve diğ. 2014, Bulut ve diğ. 2015).

3.6.2. İmmünohistokimyasal Uygulamalar

Parafin bloklardan alınan seri kesitlerde TGF- β ve VEGF için immünohistokimya tekniği uygulandı. Ayrıca apoptotik hücreler TUNEL kiti kullanılarak incelendi.

3.6.2.1. TGF- β İmmünohistokimyası

Parafin bloklardan polilizinli lamalar üzerine alınan 4 μ m'lik kesitler 56 °C'lik etüvde (2 saat) bekletildikten sonra ksilende 3'er kez 10dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Ardından, sırasıyla 2x5 dk %100'lük alkolde, 1x5 dk %96'luk alkolde, 1x5 dk %90'luk alkolde, 1x5 dk %70'lik alkolde ve son olarak 2x5 dk distile su içinde bekletildi. Kesitler sitrik asit solüsyonu içine alınarak mikrodalgada 5 dk kaynatıldı ve soğuması için 20 dk bekletildi. 2 kez 5'er dakika fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkamanın ardından kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %0.3' lük H₂O₂'de 5 dk bekletildi. 2 kez PBS'de yıkanan lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (pap pen) ile çizilerek havuz oluşturuldu. Bir kez T-PBS'de yıkanan kesitlere özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 5 dk protein blok solüsyonu uygulandı. Ardından kesitlere 1/200 dilüsyonundaki Anti-TGF- β antikor (ab 190503) uygulandı ve +4 °C'de gece boyunca bekletilerek primer antikor uygulaması yapıldı. Üç kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk biyotinlenmiş sekonder antikor (ab 97057) solüsyonunda tutuldu. Üç kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk peroksidaz solüsyonu uygulandı ve yıkama sonrasında kesitlere 5 dk DAB kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 10 sn Mayer hematoksileni uygulanarak zıt boyama yapıldı ve ardından yıkama sonrasında Entellan ile kapatıldı.

3.6.2.2. VEGF İmmünohistokimyası

VEGF için yapılan immünohistokimya uygulamasında TGF- β immün boyaması sırasında tarif edilen basamaklar izlendi. Kesitlere 1/50 dilüsyonundaki VEGF antikor

(sc-7269) uygulandı. ve +4°C'de gece boyunca bekletilerek primer antikor uygulaması yapıldı. Üç kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda (ab 97057) tutuldu. Üç kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk peroksidaz solüsyonu uygulandı ve yıkama sonrasında kesitlere 3 dk DAB kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 10 sn Mayer hematoksileni uygulanarak zıt boyama yapıldı ve ardından yıkama sonrasında entellan ile kapatıldı.

3.6.2.3. İmunohistokimya Mikrografların Kuantifikasyonu (Boyanmanın Rakamsal Hesaplanması)

İmunohistokimya mikrografların kuantifikasyonu için ImageJ softverin 'Fiji' versionu kullanıldı. (<http://fiji.sc/Fiji>). Işık mikroskop ile elde edilen standart kırmızı-yeşil-mavi (RGB) renkli görüntüler, Fiji tarafından değerlerin intensitesi (yoğunluğu) ölçülen maksimum 250 intensitesine (beyaz, boyanmamış alanlar ile temsil edilir) sahiptir. Daha fazla antijen-kromojen mevcut, alan daha koyu görünür. Bununla birlikte, koyu bölgeler daha düşük değerlerin intensitesine sahiptir, bu da antijen miktarı ve sayısal değeri arasında ters bir korelasyona neden olur (Nguyen ve diğ. 2013). Değerlerin intensitesini elde etikten sonra $OD = \log(\text{Max. intensity} / \text{Mean intensity})$ (max intensity = 255 8-bit görüntüler için) kullanarak optik yoğunluğu hesaplandı (Varghese ve diğ. 2014, Ruifrok ve diğ. 2001).

3.6.2.4. TUNEL Boyaması

Parafin bloklardan alınan 4 µm'lik kesitler 2 saat 56°C'lik etüvde bekletildikten sonra toluolde 3x10 dk bekletilerek deparafinize edildi ve derecesi azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirilip 5 dk PBS'de yıkandı. Daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K solüsyonu uygulandı ve distile su ile yıkanan (2x2 dk) kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂'de 5 dk karanlıkta bekletildi. PBS ile (2x5 dk) çalkalandıktan sonra lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 10 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de terminal deoksinükleotidil transferaz enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma tamponuyla 15 sn çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. PBS'de yıkanan (3x1 dk) kesitlere oda ısısında 30 dk anti-digoksigeninperoksidaz konjügatı uygulandı ve yıkama sonrasında 7 dk DAB kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Metil green ile zıt boyama yapılmasının ardından kesitler kapatma medyumumu ile kapatıldı. Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile tüm folikül çeşitleri ve hücreler arası stroması incelendi. Foliküllerin granuloza hücrelerinde ve stromada görülen immünoreaktif nükleuslar ayrı ayrı sayıldı.

3.7. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) ile Ultrastruktürel İncelemeler

Yaklaşık 1 mm³ boyutundaki doku örnekleri %2,5'lük 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit ile +4°C'de 12 saat fikse edildi ve PBS'e alındı. Daha sonra %2'lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyonu yapıldı. Dercesi artan alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi ve propilen oksitten geçirilerek epona gömüldü. Epona gömülen doku örnekleri polimerizasyon için 60°C'deki etüvde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Ultramikrotomda (Leica Ultracut R) alınan yaklaşık 1 µm kalınlığındaki yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyandı. Yarı ince kesitler fotomikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve dijital kamera (Olympus DP 72, Tokyo, Japonya) ile fotoğrafları çekildi. Yarı ince kesitlerde uygun bölgeler tespit edildikten sonra 60 nm kalınlığındaki ince kesitler bakır gridler üzerine alınmış ve uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır. İnce kesitler, JEOL 1200 SX II TEM ile 80kV'de incelenmiş ve dijital kamera (Morada Soft Imaging System, Olympus, USA) ile fotoğrafları alınmıştır.

3.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Deney gruplarının göreceli gen ekspresyon analizi için öncelikli olarak RNA İzolasyon Kiti (Exiqon) ile total RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Dokular homojenizator (Ika Ultra-Turrax) kullanılarak, kit içerisindeki lizis solusyonu ile homojenize edildi. Kitin önerdiği Çizimde RNAaz içermeyen su ile sulandırılıp 20 µL Proteinaz K enzimi ile 55 Cde 10 dk bekletilerek 14,000 x g de santrifüj sonrası süpernatant yeni bir tüpe aktararak hücre debris/atıkları uzaklaştırıldı. Supernatanta 450 µL 96-100% ethanol eklendi, vortex ile karıştırıldı. Bu karışım filtreli kolonlara aktarıldı. Santrifüj ile RNA içeriğinin kolonlara emdirilmesi sağlandı ve 2 defa yıkama solusyonu ile 14,000x g for 2 minutes santrifüjle yıkanan kolonlar 1 dk boş çevrilerek kalan etanolün uzaklaştırılması ile saf olarak RNA'yı içeren kolonlar temiz bir ependorf tüpüne geçirildi. 40 µL elution buffer eklenerek santrifüj ile RNA'nın ependorflara aktarılması sağlandı.

Örneklerin saflığı ve miktarı Pikodrop cihazıyla ölçüldü. Saflığın istenilen 1,8-2,0 aralığında olduğu saptandı. RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) ile komplementer DNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez reaksiyonu için önce RNA'ya polyA kuyruğuna bağlanacak Oligo DT primer eklendi thermal cyler cihazında 65°C'de 10dk primerlerin bağlanması için bekletildi. ikinci aşamada buz üzerine alınan örneğe hazırlanan ikinci karışım eklendi. Bu ikinci karışım RNAdan cDNA'yı sentezi gerçekleştirecek ters transkriptaz enzimini ve gerekli reaksiyon tamponunu ve dNTP içermektedir. Sonrasında tekrar termal cyler cihazına alınan örnek 55°C'de 30 dk,

85°C'de 5 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleşmesi sağlanmıştır. cDNA'lar -20°C'de PCR aşamasına kadar saklanmıştır.

Real time PCR reaksiyonu; SYBR içeren MasterMix solüsyonu (Invitrogen Power SYBR Green PCR Master Mix), AMH ve TGF-β genlerine uygun primerler hazırlanarak Real time PCR cihazında (Lightcycler480-II, Roche) alışılmıştır. Housekeeping (Referans) gen olarak beta aktin (ACTB) geni kullanılmıştır. Değerlendirme ΔΔCp metoduyla gerçekleştirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 paket program ve GraphPad Prism version 7.04 ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov-Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama +/- standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25. persantil-75. Persantil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA), normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Kruskal Wallis Testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanıldı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlılık için yeterli kabul edildi.

3.10. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

3.10.1. Kimyasal Malzemeler

Alfazyne (50 ml)

Ketalar (500 mg) (Pfizer: 150086)

Formaldehit (Tekkim)

Ethanol

Etil Alkol %96 (Tekkim)

Toluen

Parafin

Entellan

Metanol

Streptozotosin (STZ)

TGF-β antikoru

VEGF antikoru

Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis (TUNEL) Kit

Hidrojen Peroksit
HRP Anti-Polyvalent Sekonder Kit
DAB Chromogen Substrate Kit
Mayer's Hematoxylin
Gluteraldehit
Osmium tetroxide
Propilen oksit

3.10.2. Cihazlar

Alisei Quality System Seac Radim Company analyser (Italy/Rome)-ELISA READER
BECKMAN COULTER DXI-600 otoanalizörü
Buzdolabı (Arçelik)
Hassas terazi (Scaltec-STB31)
IKA T18 Digital ULTRA TURRAX homojenizatör
UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer- SHIMADZU
pH metre (İnolab wtw)
Vorteks (LMS)
Mikrodalga (Regal)
Etüv (Elektro-mag)
Mikrotom (Leica SM 2000R)
Işık mikroskobu (Leica DM 1000) ve Kamera (Leica DMC 2900)
Ultramikrotomda (Leica Ultracut R)
Fotomikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya)
Dijital kamera (Olympus DP 72, Tokyo, Japonya)
Derin dondurucu (BEKO)

4.BULGULAR

4.1. Atorvastatin'in Glikoz Seviyeleri Üzerine Etkisi

4.1.1. Gruplar Arası Açlık Kan Glikoz Değerlerinin Zamana Bağlı Değişimi

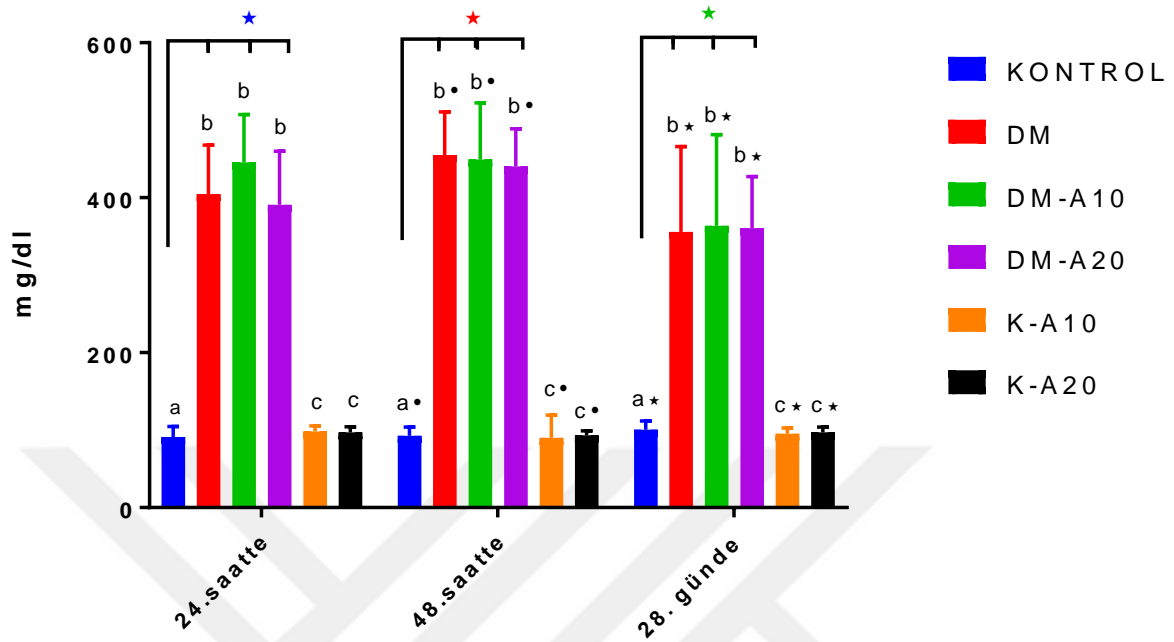
Kontrol, diyabet ve tedavi gruplarında 24., 48.saatlerde ve 28. günde kan glikoz değerleri glikometre ile ölçülerek değerlendirildi (Çizelge 4.1). STZ uygulamasından 24 ve 48 saat sonra ve uygulamanın 28. gününde yapılan ölçümlerde diyabetli deneme grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kan glikoz değerlerinde anlamlı bir artış ($p<0.0001$) saptandı. Diyabet oluşturulan gruplarda STZ'nin (60 mg / kg, i.p.) tek doz enjeksiyonu bu hayvanların% 95'inde yüksek kan glukoz seviyeleri (400 ± 70 mg/dL)'nin oluşmasına neden olmuştur. Sitrat tamponu enjekte edilen ve Atorvastatin alan kontrol gruplarında kan glukoz seviyeleri 91 ± 7 mg/dL aralığında kalmıştır (Çizelge 4.1). Diyabet kontrol (DM) grubunda ve Atorvastatin alan diyabetik sıçanlarda [(DM-A (10) ve DM-A (20)], kan glukoz seviyelerinde anlamlı bir artış ($P < 0.001$) saptandı (Çizim 4.1). STZ enjekte edilen hiperglisemik sıçanlarda poliüri, polidipsi ve düşük vücut ağırlıkları ile karakterize ağır diyabet semptomları gözlemlendi.

Çizelge 4.1. Gruplar arası açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri

(mg/dl), (n=10) (X±SD)

GLİKOZ (mg/dl)	KONTROL	DM	DM-A(10)	DM-A(20)	K-A(10)	K-A(20)	Sig.=P
Glikoz 24. saatte	92,18±12,9 ^a	383,54±92,31 ^b	421,63±98,76 ^b	387,45±66,55 ^b	98,36±6,91 ^c	96,09±7,46 ^c	P<0,0001*
Glikoz 48. saatte	93,90±11,27 ^a	450,22±56,53 ^b	418,63±123,08 ^b	428,90±46,43 ^b	100,45±9,04 ^c	93,18±5,45 ^c	P<0,0001*
Glikoz 28. günde	100,54±10,64 ^a	321,0±138,96 ^b	363,09±111,64 ^b	358,60±69,13 ^b	95,72±7,60 ^c	96,54±6,69 ^c	P<0,0001*

P<0.0001* a-b, b-a, b-c; P<0.0001* a-b, b-a, b-c; P<0.0001* a-b, b-a, b-c



Çizim 4.1. Gruplar arası açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri.

24.saatte glikoz seviyeleri: * $P < 0,0001$ a-b, b-a, b-c; 48.saatte glikoz seviyeleri: * $P < 0,0001$ a- b*, b*-a*, b*-c*; 28. günde glikoz seviyeleri: * $P < 0,0001$ a*-b*, b*-a*, b*-c*. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.1.2. Gruplar İçi Açlık Kan Glikoz Değerlerinin Zamana Bağlı Değişimi

Kontrol, diyabet ve tedavi gruplarında 24., 48.saatte ve 28. günde açlık kan glikoz değerleri glikometre ile ölçülerek değerlendirildi ve kıyaslandığında istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde oldukça anlamlı bir artış belirlendi (Çizelge 4.2 ve Çizim 4.2).

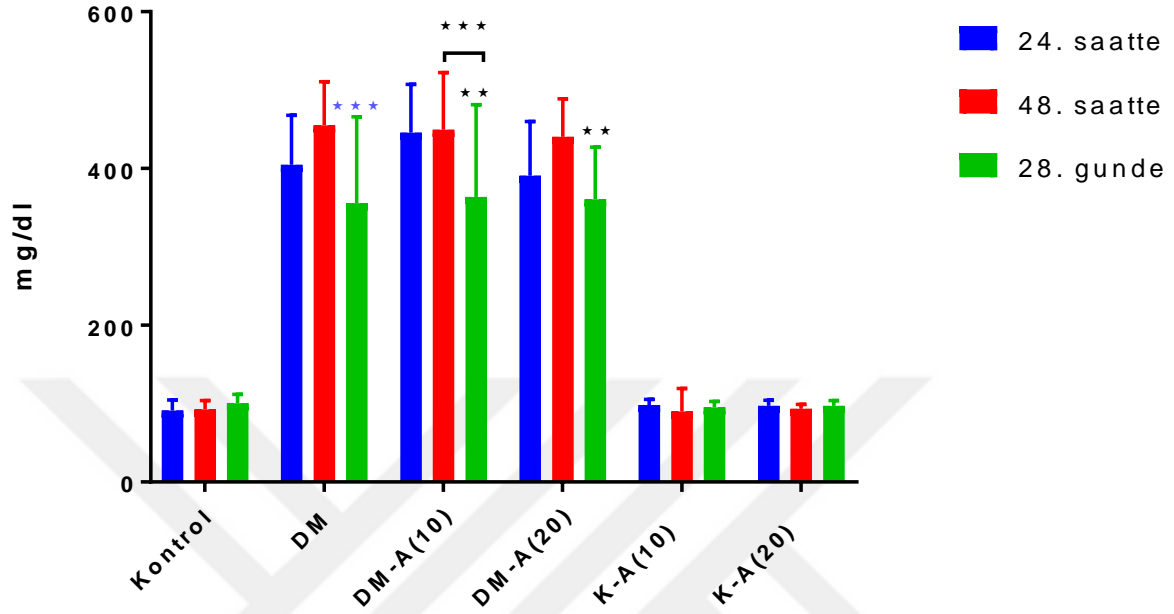
Zamana bağlı kan glikoz düzeylerinin ölçümlerini değerlendirdiğimizde 28. gün ölçümlerinin 48. saate göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu gözlemledik.

Çizelge 4.2. Gruplar içi açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri

(mg/dl), (n=10) (X±SD)

Glikoz Düzeyleri (mg/dl)	24.saatte	48.saate	28. günde	Sig.=P
Kontrol	91,30±13,30	92,70±11,30	100,70±11,20	
DM	404,70±63,24 ^a	455,20±55,57 ^b	355,70±110,33 ^c	P<0.0001***
DM-A(10)	445,60±61,79 ^a	449,30±73,08 ^b	363,90±117,64 ^c	P=0.00013** P=0.0007***
DM-A(20)	390,90±69,11 ^a	440,40±48,54 ^b	360,90±66,44 ^c	P=0.0018**
K-A (10)	98,20±7,269	90,20±29,15	95,20±7,80	
K-A(20)	97,00±7,19	93,50±5,64	97,30±6,55	

P<0.0001*** b-c Diyabet grubu, 48.saatte ve 28. günde arasında fark var. P=0.00013** a-c DM-A(10) grubu, 24. saatte ve 28. günde arasında fark var. P=0.0007*** b-c DM-A(10) grubu 48. saatte ve 28. günde arasında fark var. P=0.0018** b-c DM-A(20) grubu 48. saatte ve 28. günde arasında fark var.



Çizim 4.2. Gruplar içi açlık kan glikoz değerlerinin zamana bağlı değişimleri.

*** P<0.0001 Diyabet grubu, 48. saatte ve 28. günde arasında önemli fark var. ** P=0.00013 DM-A(10) grubu, 24. saatte ve 28. günde arasında fark var. *** P=0.0007 DM-A(10) grubu 48. saatte ve 28. günde arasında fark var. ** P=0.0018 DM-A(20) grubu 48. saatte ve 28. günde arasında fark var.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2. Atorvastatin'in Vücut Ağırlığı Üzerine Etkisi

4.2.1. Vücut Ağırlıklarının Zamana Bağlı Olarak Grup İçi Değişimi

Diyabet ve diyabet tedavi grupları arasında vücut ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001). Diyabet grubundaki (DM) sıçanların ağırlıkları deneylerin sonuna kadar düşmeye devam etti. 150 g altındaki hayvanlar öldü. 10mg/kg Atorvastatin alan gruptaki [DM-A(10)] sıçanların ağırlıkları, enjeksiyondan sonraki hafta hızla düştü, ilaç aldıktan sonra toparlanma fark edildi ve kilo kaybı durdu. 20 mg/kg Atorvastatin alan gruptaki [DM-A(20)] sıçanların ağırlıkları,

enjeksiyondan sonraki hafta hızla düştü, ilaç aldıktan sonra toparlanma fark edildi ve kilo kaybı durdu ve başlangıç ağırlıklarına dönmeye başladı.

Atorvastatin ile tedavi edilen diyabetik olmayan gruplar, ilk hafta (Atorvastatin tedavisine henüz başlanmadığı dönemde) vücut ağırlığında sürekli bir artış gösterdi. Ancak, 21 gün boyunca 10mg/kg/gün Atorvastatin ile tedavi edilen gruplarda, vücut ağırlıkların artışı durdu ve 20mg/kg/gün Atorvastatin dozu K-A(20) grubunda vücut ağırlığında hafif bir düşmeye neden oldu (Çizelge 4.3 ve Çizim 4.3).



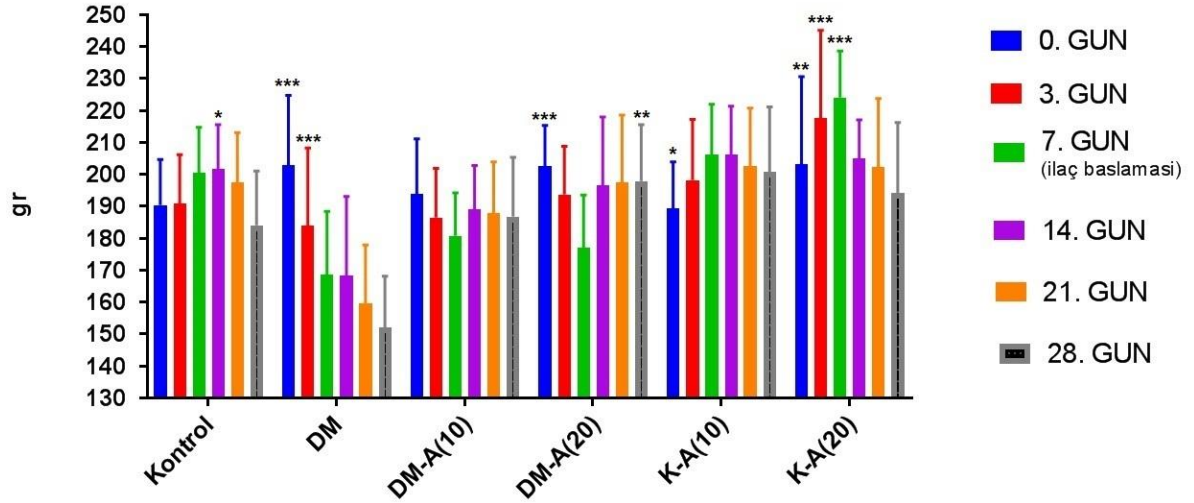
Çizelge 4.3. Grup içi deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının günler arası değişimleri

(gr), (n=10) (X±SD)

Gruplar	0.gün	3.gün	7.gün (ilaca başlanması)	14.gün	21.gün	28.gün	Sig.=P P<0.0001
Kontrol	190,4±14,28	190,9±15,32	200,4±14,40 ^a	201,6±14,03 ^b	197,5±15,60	184,10±17,07 ^c	P=0.02 P=0.01
DM	202,8±22,00 ^a	184±24,28 ^b	168,5±19,96 ^c	168,4±24,73 ^c	159,5±18,04 ^{c*}	152,10±16,05 ^{c*}	P=0.004 P<0.0001
DM-A(10)	193,8±17,40	186,5±15,45	180,8±13,46	189±13,85	187,8±16,16	186,80±18,56	
DM-A(20)	202,7±12,65 ^a	193,7±15,10	177±16,56 ^b	196,5±21,49 ^c	197,4±21,17 ^c	197,90±17,71 ^d	P=0.002 P=0.001 P<0.0001
K-A(10)	189,4±14,53 ^a	198,2±19,08	206,2±15,78 ^b	206,1±15,29 ^b	202,5±18,32	200,90±20,22	P=0.01
K-A(20)	203,2±27,45 ^a	217,7±27,45 ^b	224,1±14,60 ^c	204,9±12,23	202,3±21,46 ^d	194,10±22,15 ^c	P=0.001 P=0.0001 P<0.0001

P=0.02 a-b Kontrol grubu 7. gün ve 14. gün; **P=0.01 b-c** 14. gün ve 28. gün arası fark saptandı. **P=0.004 a-b** DM grubu, 0. ve 3. gün arası; **P<0.0001 a-c, b-c*** 0. gün ve 7. 14. 21. 28. günler arası, 3. gün ve 21, 28. günler arası önemli bir fark saptandı. **P=0.002 b-c** DM-A(20) grubu 7. günün ve 14. ve 21. günler arası; **P=0.001 b-d** 7.gün ve 28. gün arası; **P<0.0001 a-b** 0. gün ve 7. gün arası önemli bir fark saptandı.

P=0.01 a-b K-A(10) grubu 0. ve 7. 14. günler arası fark var; **P=0.001 a-c** K-A(20) grubu 0. ve 7. gün arası; **P=0.0001 b-e, c-d** 3. ve 28. gün, 7. ve 21 gün arası önemli bir fark saptandı; **P<0.0001 c-e** 7. gün ve 28. gün arası önemli bir fark saptandı.



Çizim 4.3. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının grup içi günler arası değişimleri

* P=0.01 Kontrol grubu 14.gün ve 28.gün arası fark saptandı; K-A(10) grubu 0. ve 7. 14. günler arası fark var. ** P=0.001 DM-A(20) grubu 7.gün ve 28. gün arası; K-A(20) grubu 0. ve 7. gün arası fark saptandı. *** P<0.0001 DM grubu 0. gün ve 7. 14. 21. 28. günler arası, 3. gün ve 21, 28. günler arası önemli bir fark saptandı; DM-A(20) grubu 0. gün ve 7. gün arası önemli bir fark saptandı; K-A(20) grubu 3. ve 28. gün, 7. ve 21. 28. günler arası önemli bir fark saptandı.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2.2. Vücut Ağırlıklarının Gruplar Arası Değişimleri

Atorvastatin tedavi ile edilen diyabetik ve non diyabetik gruplarda 28. günde vücut ağırlarında yükseliş saptandı. En büyük fark K-A(20) ve DM gruplar arasında saptandı ($P<0.003$).

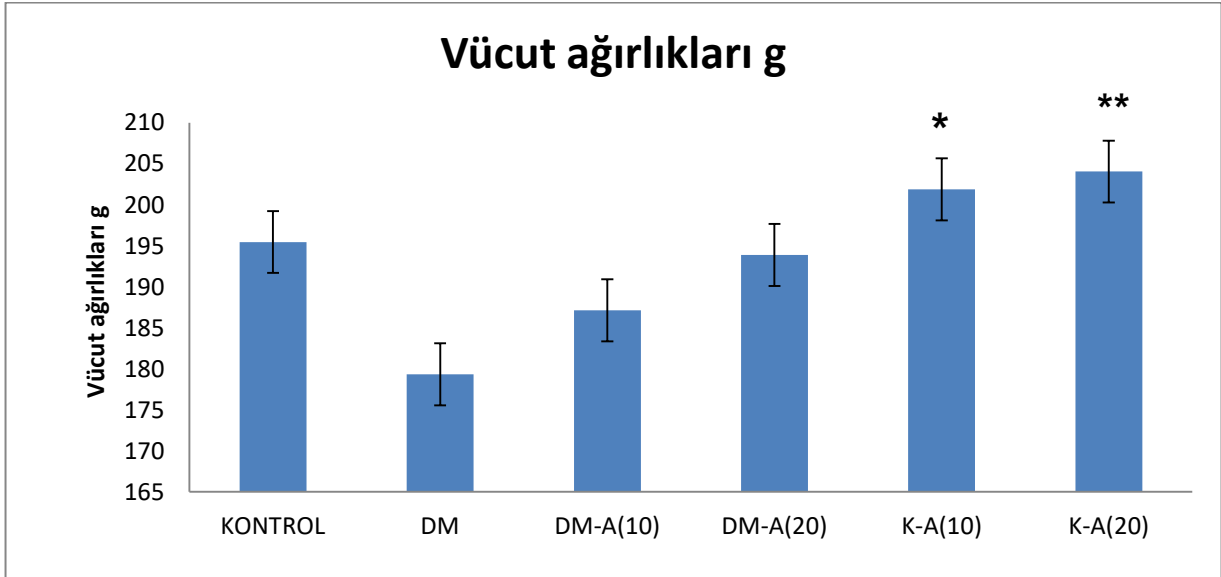
Deneyin sonunda sağlıklı Atorvastatin alan gruplar vücut ağırlıkları en yüksekti. DM grubunda ise vücut ağırlıkları en düşüktü (Çizelge 4.4 ve Çizim 4.4).

Çizelge 4.4 Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası değişimleri

(gr), (n=10) ($X\pm SD$)

Gruplar	($X\pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	195,5 \pm 7.4	<0,05 * +
DM	179,3 \pm 17.87	
DM-A(10)	193,9 \pm 14.32	
DM-A(20)	187,1 \pm 13.59	
K-A(10)	201,8 \pm 13.0	
K-A(20)	204,0 \pm 18.9	

* $P<0,008$ K-A(10) ve DM arasında fark saptandı. + $P<0,003$ K-A(20) ve DM arasında fark saptandı.



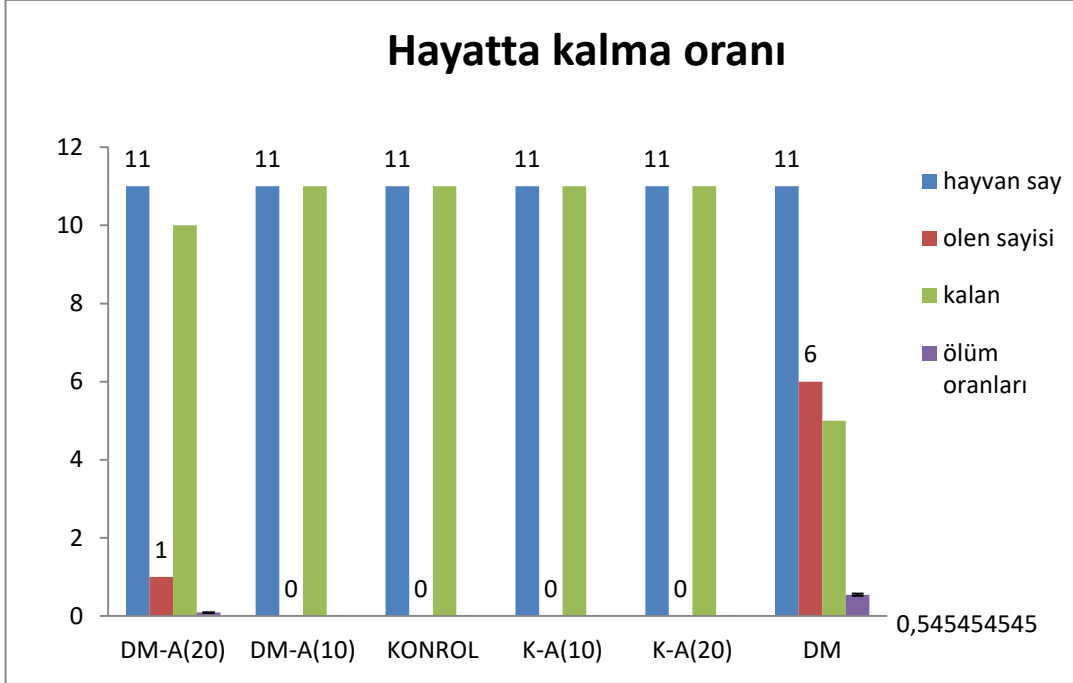
Çizim 4.4. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası değişimleri.

$P<0,008$ * DM grubu ile kıyaslandığında arasında fark saptandı. $P<0,003$ ** DM grubu ile kıyaslandığında arasındaki fark saptandı.

Gruplardaki değerler ortalama (X) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.2.3. Hayatta Kalma Oranı

DM grubunda, sıçanların >%50, çalışmanın sonuna ulaşmadan (28 gün) öldü. Atorvastatin ile tedavi edilen diyabetik ve nondiyabetik kontrol gruplarında mortalite gözlenmedi (Çizim 4.5).



Çizim 4.5. Deneysel hayvanların farklı gruplarda hayatta kalma oranının karşılaştırılması.

4.3. Biyokimya Bulguları

4.3.1. Atorvastatin'in Serum İnsulin Seviyeleri Üzerine Etkisi

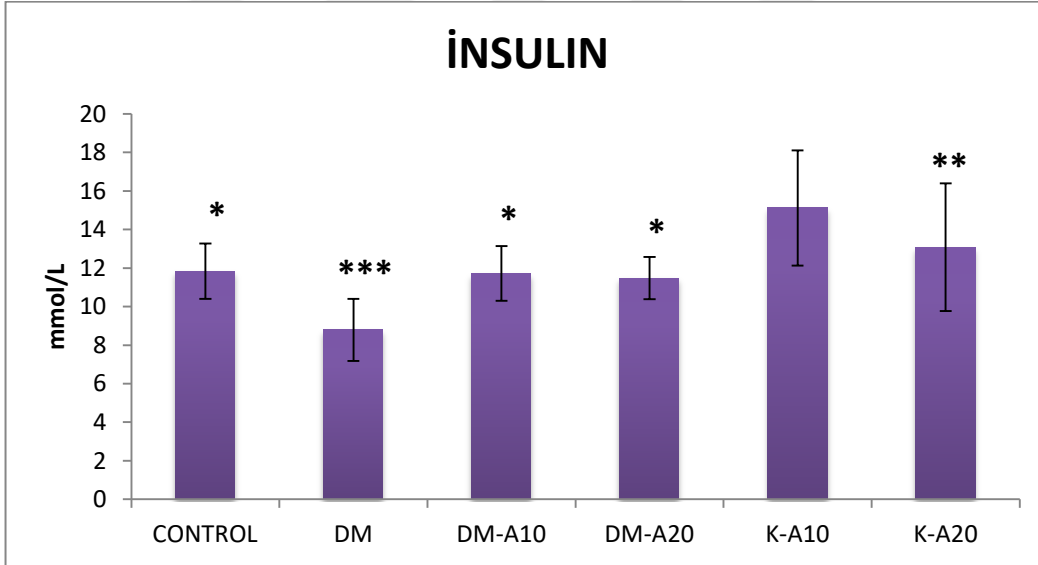
Diyabet (DM) grubunda beklediğimiz gibi insülin seviyeleri düşük bulundu. Fakat göze çarpan bulgu DM ve Atorvastatin ile tedavi edilen gruplarda, insülin seviyeleri ($11,72 \pm 1,42$ ve $11,47 \pm 1,09$), DM grubundakiler ile karşılaştırıldığında ($8,79 \pm 1,61$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p < 0,05$) yükseldi (Çizelge 4.5 ve Çizim 4.6).

Çizelge 4.5. Deney hayvanlarının serum İnsulin seviyelerinin karşılaştırılması

(ng/mL), (n=8)

Grup	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	11,83 ± 1,43	<0,05*^+
DM	8,79± 1,61	
DM-A(10)	11,72± 1,42	
DM-A(20)	11,47±1,09	
K-A(10)	15,12± 2,99	
K-A(20)	13,08±3,31	

* P<0.05 Kontrol, DM-A(20). DM-A(10) ile K-A(10) arasında fark var. ^ P<0.005 DM ile K-A(20), arasında fark var. +P<0.001 DM ile K-A(10) arasında fark var.



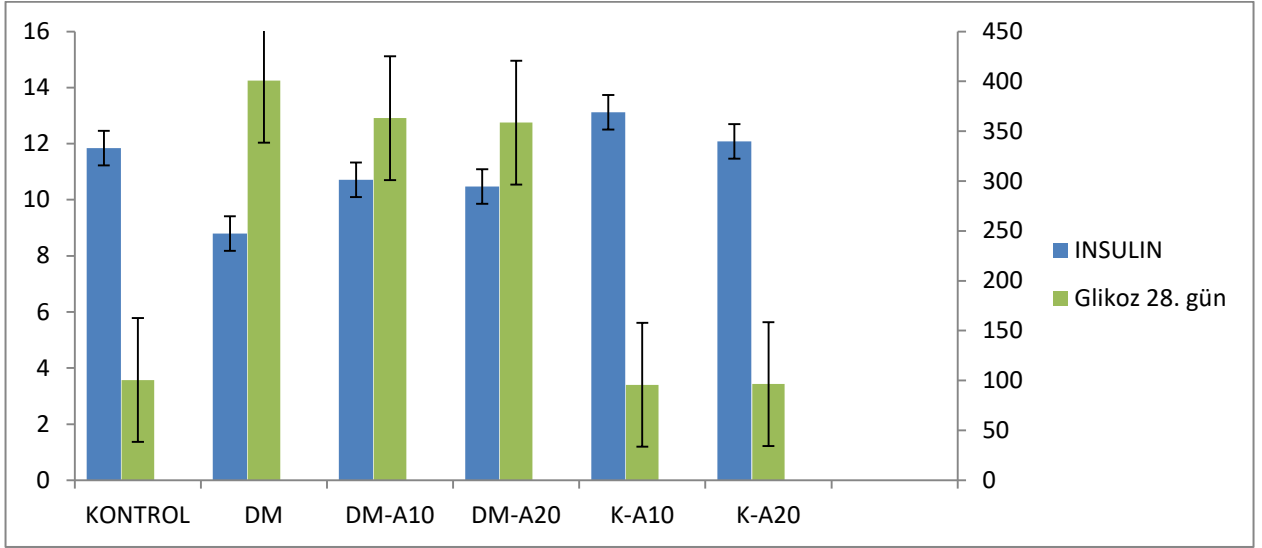
Çizim 4.6. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum İnsulin seviyelerinin karşılaştırılması.

P<0.05 * K-A(10) grubu ile kıyaslandığında; P<0.005 ** DM grubu ile kıyaslandığında; P<0.001 *** K-A(10) grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.2. Atorvastatin'in İnsülin Direnci Üzerine Etkisi

Çalışmamızda insülin ve glikoz sonuçlarına göre insülinin yükselmesine rağmen, glikozun düşmediğini gözlemledik ve bunun bir insülin direnci olduğunu belirledik (Çizim 4.7). Bunu daha iyi değerlendirmek için her hayvanın kan sonuçlarına ait HOMA-IR formülü kullanarak insülin direncini hesapladık (Çizelge 4.6 ve Çizim 4.8).



Çizim 4.7. Deney hayvanlarının grup içi İnsülin ve glikoz seviyelerinin karşılaştırılması.

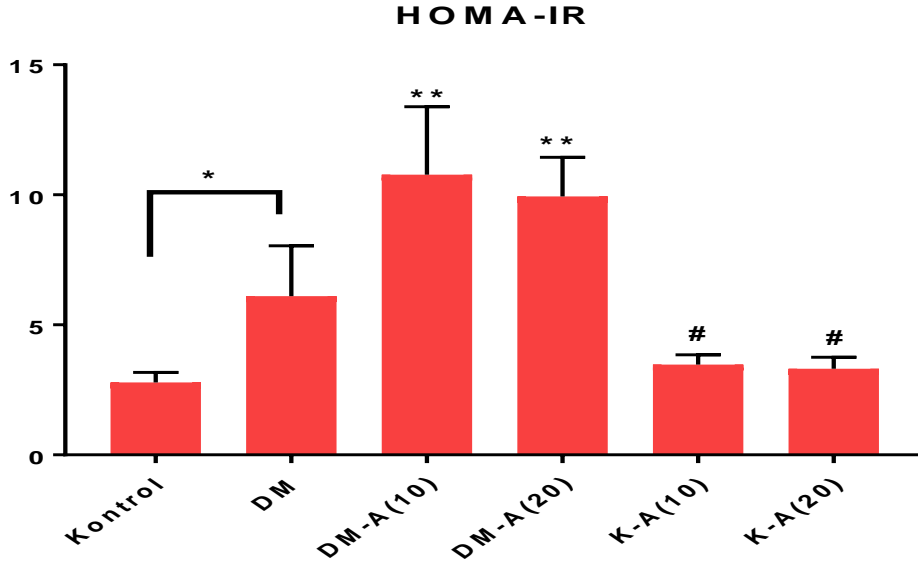
10 ve 20 mg/kg/ gün Atorvastatin alan gruplar, diğer kontrol grupları ile kıyaslandığında, insülin direncin değerleri daha yüksek çıktı ($P < 0.0001$).

Çizelge 4.6. Deney hayvanlarının farklı gruplarında İnsülin direnci: HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)'nin karşılaştırılması.

Gruplar	($\bar{X} \pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	2,79±0,38	<0,005*+^
DM	6,1 ±1,94	
DM-A(10)	10,78 ± 2,61	
DM-A(20)	9,94±1,51	
K-A(10)	3,47±0,37	
K-A(20)	3,31±0,43	

* $P < 0.005$ DM ve K-A(20) arasında fark var; + =0.0008 Kontrol ve DM arasında fark var;

^ $P < 0.0001$ DM-A(10) ve DM-A(20), Kontrol grubu ile kıyaslandığında; DM-A(10) ve DM-A(20), DM grubu ile kıyaslandığında; K-A(10) ve K-A(20), DM-A(10) grubu ile kıyaslandığında; K-A(10) ve K-A(20), DM-A(20) grubu ile kıyaslandığında;



Çizim 4.8. Deneysel hayvanların farklı gruplarda İnsulin direnci (HOMA-IR Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)'nin karşılaştırılması.

P=0.0008 *Kontrol ve DM arası fark; P<0.0001 ** Kontrol ve DM grupları ile kıyaslandığında; # DM-A(10) ve DM-A(20) grupları ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.3. Atorvastatin'in Serum AMH Seviyeleri Üzerine Etkisi

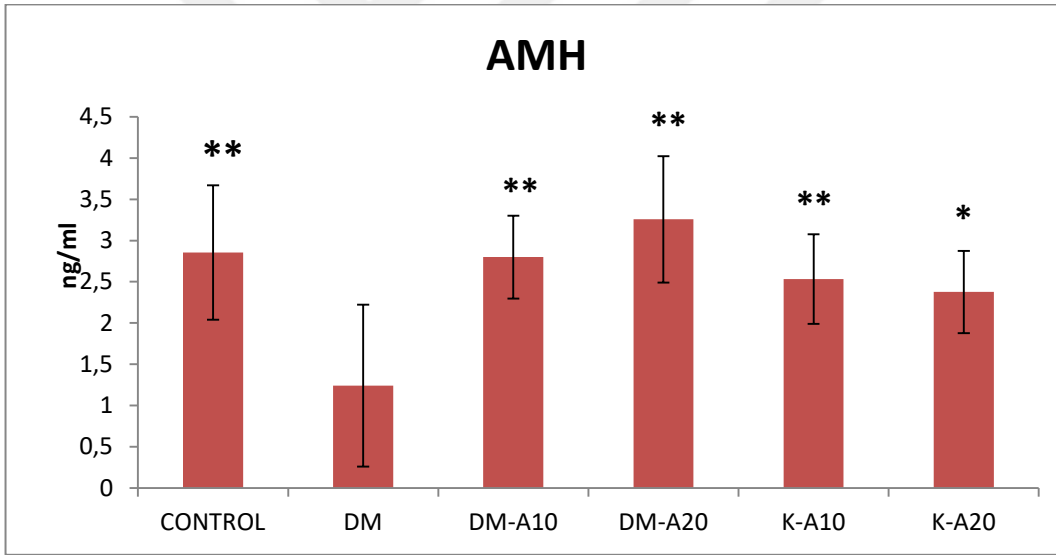
AMH seviyelerinde, DM grubunda önemli bir düşüş gözlemlendi. Atorvastatin alan diyabetik gruplarında doza bağımlı bir yükseliş fark edildi (Çizelge 4.7 ve Çizim 4.9).

Çizelge 4.7. Deney hayvanlarının serum AMH (Anti Mullerian Hormon) seviyelerinin karşılaştırılması

(ng/mL), (n=8)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	2,85± 1,43	<0,005 ⁺⁺
DM	1,24± 0,99	
DM-A(10)	2,80±0,50	
DM-A(20)	3,26±0,77	
K-A(10)	2,53±0,54	
K-A(20)	2,38±0,50	

. *P=0.03 K-A(20) DM grubu ile kıyaslandığında; ++P<0.001 Kontrol, DM-A(10), DM-A(20), K-A(10) DM grubu ile kıyaslandığında.



Çizim 4.9. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum AMH (Anti Mullerian Hormon) seviyelerinin karşılaştırılması.

P<0.001 ** DM grubu ile kıyaslandığında; P=0.03 * DM grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

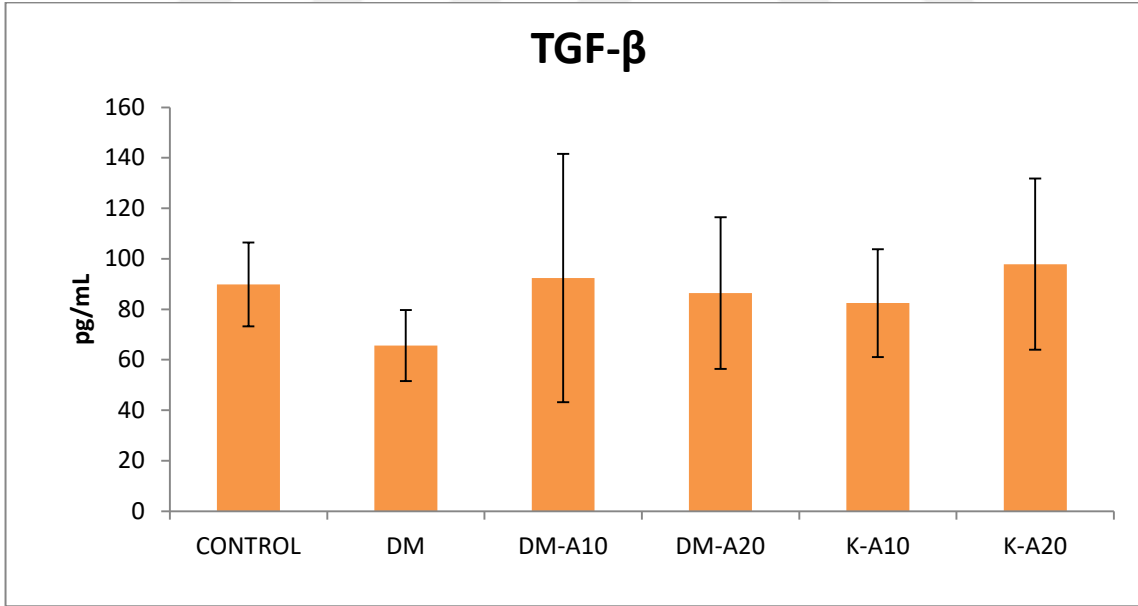
4.3.4. Atorvastatin'in Plazma TGF- β Seviyeleri Üzerine Etkisi

Gruplar arası Plazma TGF- β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen, DM grubunda plazma TGF- β seviyeleri diğer gruplara göre daha düşük bulundu (Çizelge 4.8 ve Çizim 4.10).

Çizelge 4.8. Deney hayvanlarının Plazma TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) seviyelerinin karşılaştırılması (pg/mL), (n=8)

Gruplar	($\bar{X} \pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	98,00 \pm 26,32	0,384
DM	73,01 \pm 27,49	
DM-A(10)	83,57 \pm 43,95	
DM-A(20)	79,10 \pm 30,7	
K-A(10)	73,47 \pm 19,57	
K-A(20)	92,37 \pm 35,25	

Gruplar arası TGF- β 'nin istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Çizim 4.10. Deney hayvanlarının farklı gruplarda Plazma TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) seviyelerinin karşılaştırılması.

Gruplar arası TGF- β 'nin istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X}) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.5. Atorvastatin'in Plazma Pentraksin-3 Seviyeleri Üzerine Etkisi

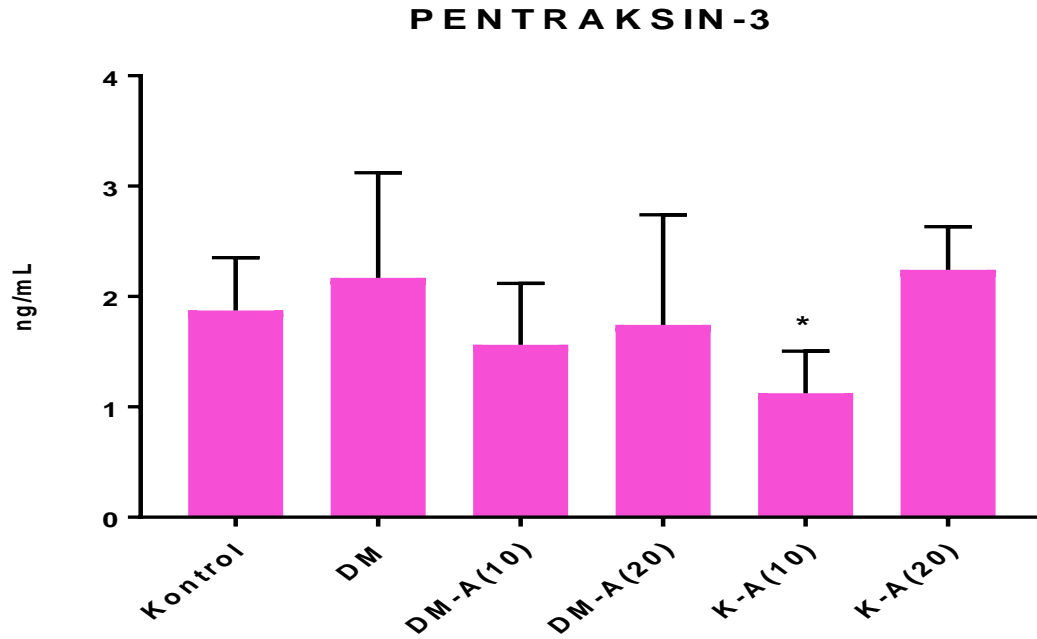
Plazma Pentraksin-3 seviyeleri DM grubunda yükseldi. Atorvastatin alan diyabet grubunda plazma Pentraksin-3 seviyeleri hafif düştü. En düşük plazma Pentraksin-3 seviyeleri, 10 mg/kg Atorvastatin alan kontrol grubunda bulundu ve 20 mg/kg Atorvastatin alan kontrol grubu ile arasında istatistiksel fark saptandı. K-A(20) grubunda Atorvastatin'in toksik etkisi ortaya çıktı (Çizelge 4.9 ve Çizim 4.11).

Çizelge 4.9. Deney hayvanlarının Plazma Pentraksin-3 seviyelerinin karşılaştırılması

(ng/mL), (n=8)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	1,87±0,48	P<0,05* ⁺
DM	2,17±0,95	
DM-A(10)	1,56±0,56	
DM-A(20)	1,74±0,99	
K-A(10)	1,12±0,38	
K-A(20)	2,24±0,4	

. *P=0.03 DM ile K-A(10) arasi fark var; +P=0.02 K-A(10) ile K-A(20) arasi fark var.



Çizim 4.11. Deney hayvanlarının farklı gruplarda Plazma Pentraksin-3 seviyelerinin karşılaştırılması. P<0.05 * DM ve K-A(20) grubu ile kıyaslandığında.

4.3.6. Atorvastatin'in Serum MDA ve GSH Seviyelerinin Üzerine Etkisi

Serum MDA Seviyeleri

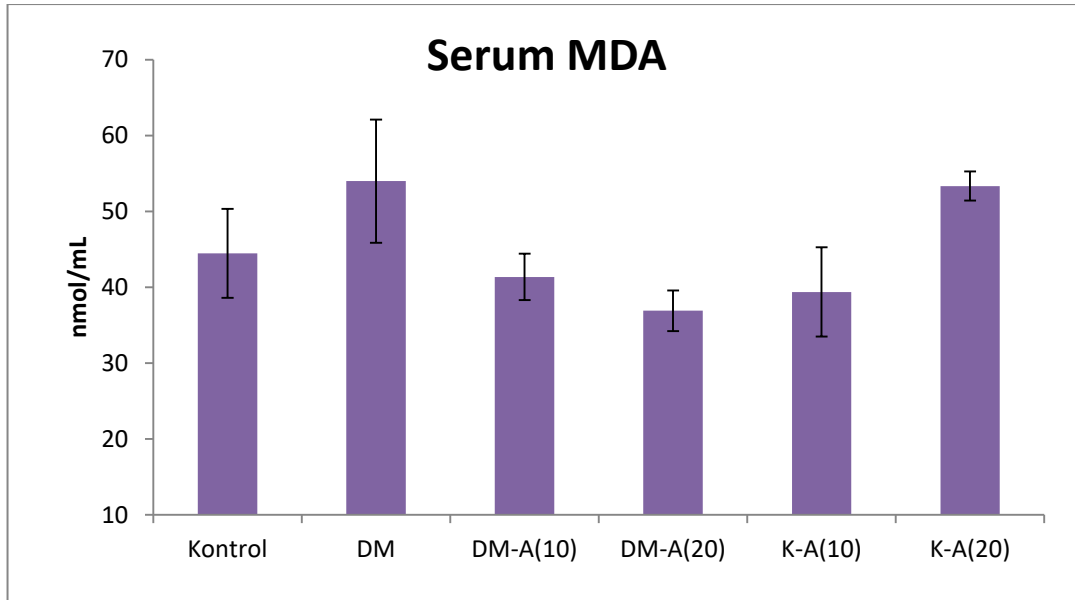
Gruplar arası serum MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen, DM ve 20 mg/kg Atorvastatin alan kontrol grubunda, MDA seviyeleri en yüksek olduğunu fark edildi. 20 mg/kg Atorvastatin alan sağlıklı grupta ilacın zararlı ve toksisiteye ortaya çıkardığı fark edildi (Çizelge 4.10 ve Çizim 4.12).

Çizelge 4.10. Deney hayvanlarının serum MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.

nmol/mL (n=11)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	44,46±19,47	0,07
DM	53,10±22,99	
DM-A(10)	41,36±10,16	
DM-A(20)	36,91±8,48	
K-A(10)	39,37±6,63	
K-A(20)	53,34±19,53	

Gruplar arası serum MDA seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Çizim 4.12. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.

Gruplar arası serum MDA seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

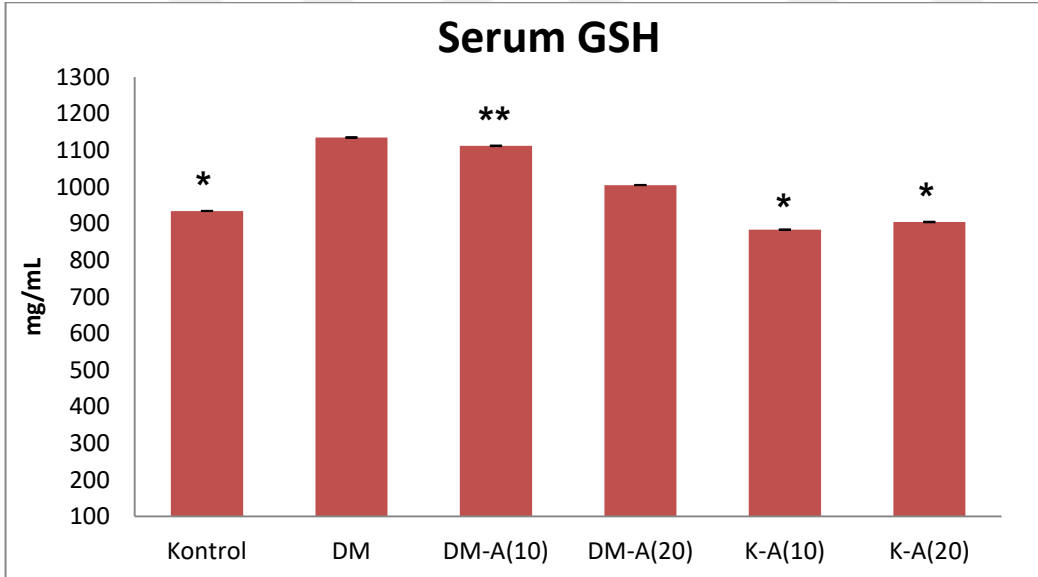
Serum GSH Seviyeleri

Gruplar arası serum GSH seviyelerinde istatistiksel olarak K-A(10) ile DM-A(10) grubu arasında anlamlı bir fark saptandı ve DM ve 10 mg/kg Atorvastatin alan kontrol grubunda, GSH seviyeleri en yüksek olduğunu fark edildi (Çizelge 4.11 ve Çizim 4.13).

Çizelge 4.11. Deney hayvanlarının serum GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması. mg/mL (n=11)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	0,09±0 ,01	<0.05*+
DM	0,11± 0,01	
DM-A(10)	0,11±0 ,02	
DM-A(20)	0,10±0 ,01	
K-A(10)	0,09±0 ,02	
K-A(20)	0,09±0 ,01	

*P<0.05 Kontrol, K-A(10), K-A(20), DM grubu ile kıyaslandığında; Kontrol, K-A(20), DM-A(10) grubu ile kıyaslandığında; +P=0.006 K-A(10) ile DM-A(10) grubu arasında.



Çizim 4.13. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması.

P<0.05 * DM grubu ile kıyaslandığında; P=0.006 ** K-A(10) grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.7. Atorvastatin'in Lipid Profili Üzerine Etkisi

Serum TG ve TG/HDL oranı anlamlı derecede artarken, serum HDL düzeyi diyabetik sıçanlarda (DM) normal kontrol sıçanlarına göre anlamlı olarak ($P < 0.05$) azaldı (Çizelge 4.12).

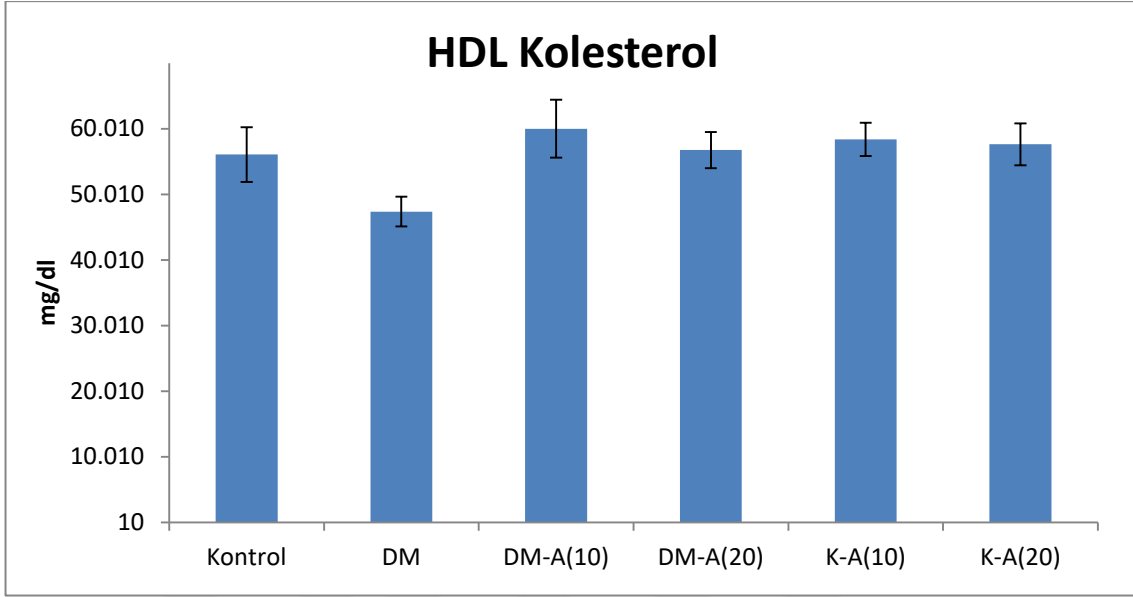
Atorvastatin'in HDL Kolesterol Üzerine Etkisi

Gruplar arası serum HDL Kolesterol seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen, DM grubunda HDL Kolesterol seviyelerinin en düşük olduğu fark edildi ve Atorvastatin alan gruplarda, HDL Kolesterol seviyeleri yükseldi (Çizelge 4.12 ve Çizim 4.14).

Çizelge 4.12. Deney hayvanlarının serum HDL-Kolesterol seviyelerinin karşılaştırılması.
mg/dl (n=8)

Gruplar	($X \pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	56,06 \pm 11,84	0,136
DM	47,37 \pm 6,43	
DM-A(10)	60,00 \pm 12,49	
DM-A(20)	56,75 \pm 7,78	
K-A(10)	58,37 \pm 7,23	
K-A(20)	57,62 \pm 9,07	

İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Çizim 4.14. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum HDL (High Density Lipoprotein) Kolesterol seviyelerinin karşılaştırılması.

Gruplar arası serum HDL seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.8. Atorvastatin'in Trigliserid Seviyeleri Üzerine Etkisi

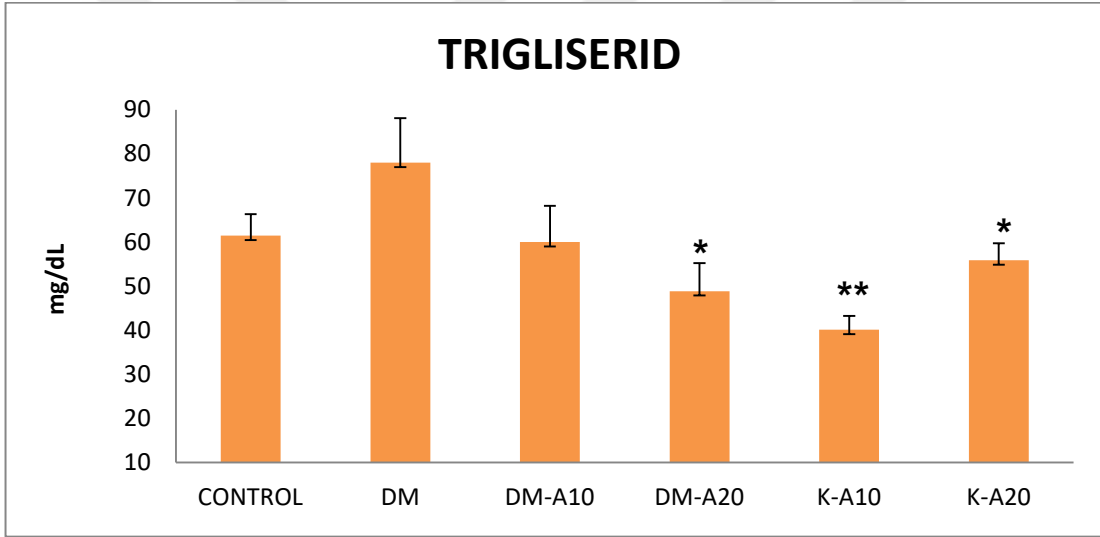
Atorvastatin, serum trigliserit seviyeleri üzerinde doza bağlı bir etki gösterdi ve 20 mg/kg/g Atorvastatin alan siçanlar (diyabetik ve diyabetik olmayan gruplar) DM grubu ile karşılaştırıldığında, TG düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. ($p < 0.05$) Ancak, tedavi edilmemiş diyabetik grup (DM) ile karşılaştırıldığında, 10 mg/kg/gün Atorvastatin alan sağlıklı grupta (K-A (10)) TG düzeylerini anlamlı düzeyde düşürdü ($p < 0.005$). Atorvastatinin 20 mg/kg/gün doz, diyabetik olmayan grup için olası bir toksik etki göstermektedir (Çizelge 4.13 ve Çizim 4.15).

Çizelge 4.13. Deney hayvanlarının serum Trigliserid seviyelerinin karşılaştırılması.

mg/dl (n=8)

Gruplar	($\bar{X} \pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	61,44±13,01	P<0,05* ⁺
DM	78,00±31,06	
DM-A(10)	60,00±23,12	
DM-A(20)	48,87±18,02	
K-A(10)	40,12±8,81	
K-A(20)	46,87±10,84	

*P<0.05 DM-A(20), K-A(20) grupları, DM grubu ile kıyaslandığında;
+ P< 0.005 K-A(10) ile DM grubu arasında fark.



Çizim 4.15. Deney hayvanlarının farklı gruplarda serum Trigliserid seviyelerinin karşılaştırılması.

P<0.05 * DM grubu ile kıyaslandığında; P<0.005 ** DM grubu ile kıyaslandığında.
Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.8. Atorvastatin'in Trigliserid ile HDL Kolesterol Oranı Üzerine Etkisi

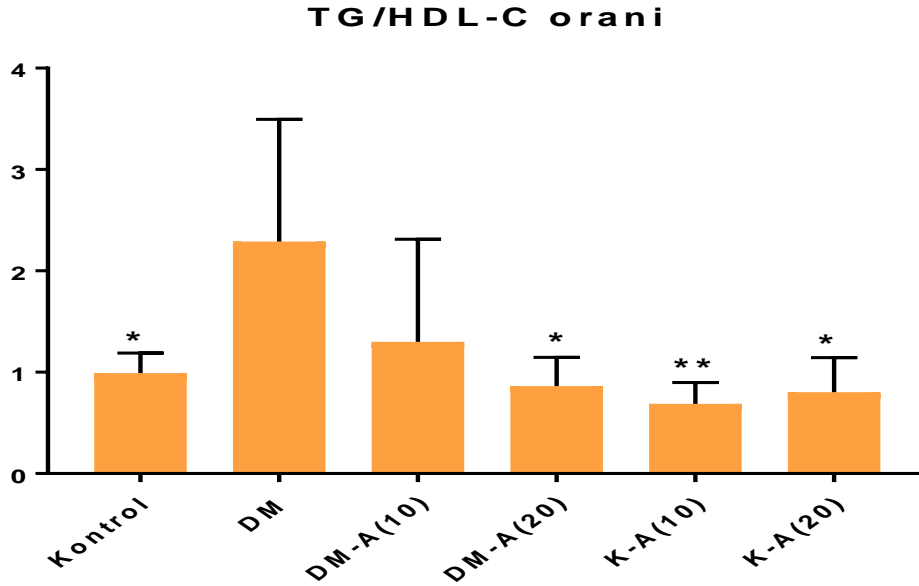
DM grubunda TG daha yüksekti ve HDL kolesterol daha düşüktü, bu da TG / HDL kolesterol oranlarının daha yüksek olmasına neden oldu. Atorvastatin kullanımı, bu parametre için tekrar doz bağımlı etki gösterdi. Atorvastatin ile tedavi edilen diyabetik gruplarda 20 mg / kg dozunda bu oran DM grubuna göre 10 mg / kg dozdan daha fazladır (P <0.005). Bu doz,

sağlıklı nondiabetik gruplar üzerinde aynı etkiyi göstermemiştir; bu oran düşüktür ancak 10 mg / kg / d'lik doz büyük bir farklılık ($P < 0.0005$) gösterdi (Çizelge 4.14 ve Çizim 4.16).

Çizelge 4.14. Deney hayvanlarının Trigliserid ile HDL Kolesterol oranlarının karşılaştırılması.

Gruplar	($\bar{X} \pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	0,99±0,20	<0,05* ⁺
DM	2,29±1,21	
DM-A(10)	1,30±1,01	
DM-A(20)	0,86±0,28	
K-A(10)	0,69±0,21	
K-A(20)	0,80±0,34	

* $P < 0.005$ Kontrol, DM-A(20) ve K-A(20) DM grubu ile kıyaslandığında; + $P = 0.0004$ K-A(10) ile DM grubu arasında fark.



Çizim 4.16. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda Trigliserid ile HDL Kolesterol oranının karşılaştırılması.

$P < 0.005$ * DM grubu ile kıyaslandığında; $P = 0.0004$ ** DM grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X})±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.3.9. Atorvastatin'in Ovaryum Dokusu MDA ve GSH Seviyeleri Üzerine Etkisi

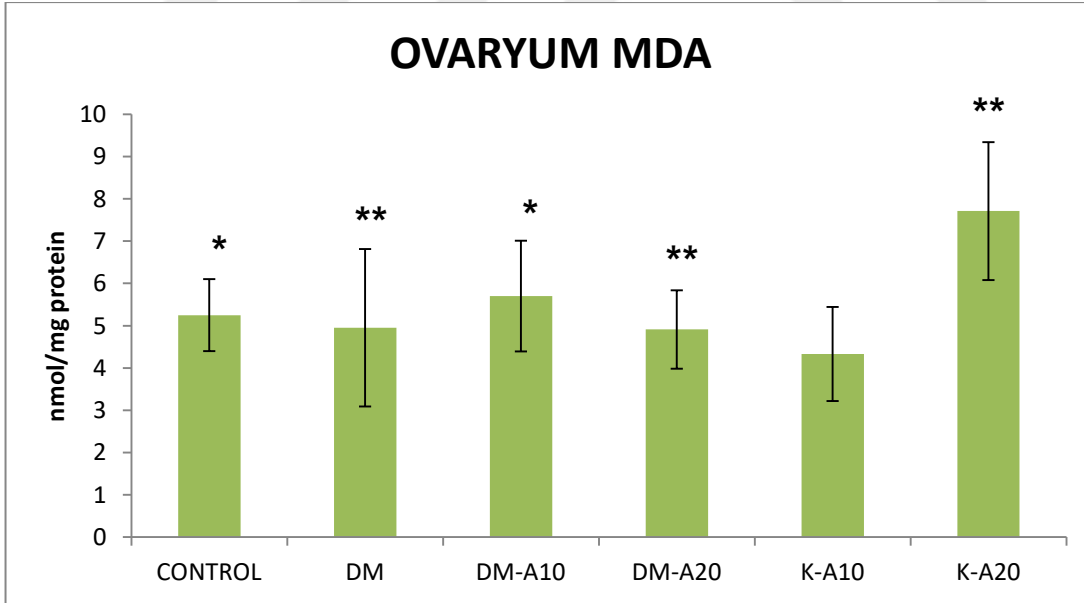
Atorvastatin'in Ovaryum Dokusu MDA Seviyeleri Üzerine Etkisi

MDA seviyeleri en yüksek olduğu grup- K-A(20) grubudur. Bu bir daha 20 mg/kg dozda kullanılan ilacın ovaryum üzerinde toksik ve zararlı etkisini gösterdi (Çizelge 4.15 ve Çizim 4.17).

Çizelge 4.15. Deney hayvanlarının ovaryum dokusu MDA seviyelerinin karşılaştırılması nmol/mg protein (n=11)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	5,25±0,89	<0,05* ⁺
DM	4,95±1,84	
DM-A(10)	5,70±1,39	
DM-A(20)	4,91±0,95	
K-A(10)	4,33±1,13	
K-A(20)	7,71±1,62	

*P<0.05 Kontrol ve DM-A(10) gruplari, K-A(20) grubu ile kıyaslandığında; +P=0.000 DM, DM-A(20) K-A(20) gruplari, K-A(20) grubu ile kıyaslandığında.



Çizim 4.17. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda ovaryum dokusu MDA (Malondialdehid) seviyelerinin karşılaştırılması.

P=0.000 ** K-A(10) grubu ile kıyaslandığında; P<0.05 * K-A(20) grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

Atorvastatin'in Ovaryum Dokusu GSH Seviyeleri Üzerine Etkisi

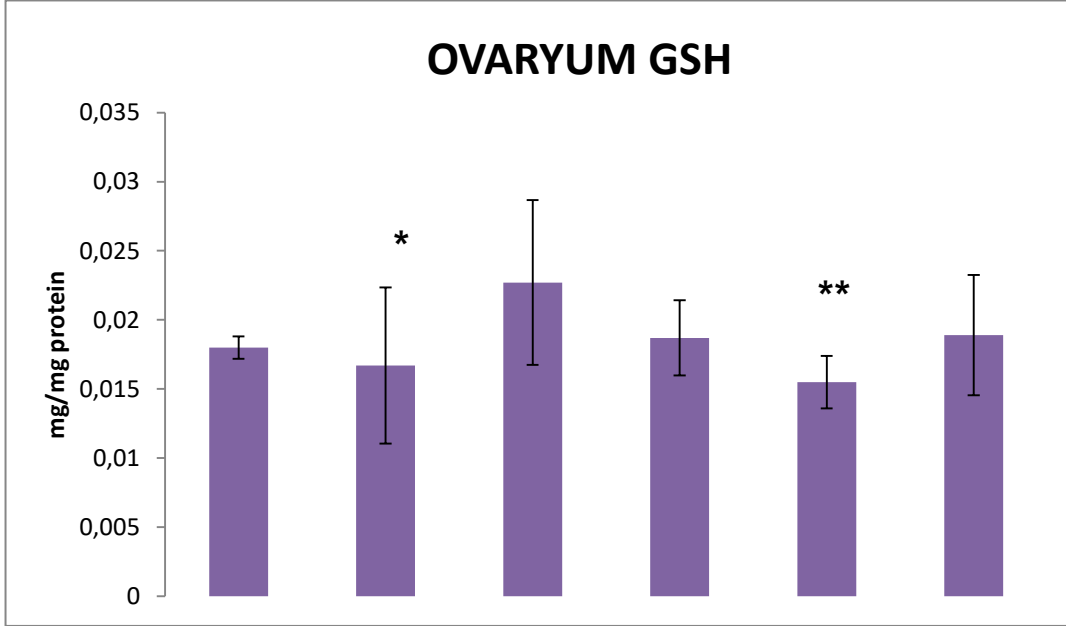
10 ve 20 mg/kg Atorvastatin alan hasta gruplarında, ovaryumda GSH seviyeleri yükseldi ve bu Atorvastatinin antioksidan özelliğe sahip olduğunu kanıtlamaktadır (Çizelge 4.16 ve Çizim 4.18).

Çizelge 4.16. Deney hayvanlarının ovaryum dokusu GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması

mg/mgprotein (n=11)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	0,02±0,00	<0,05 ^{*+}
DM	0,016±0,005	
DM-A(10)	0,022± 0,005	
DM-A(20)	0,019±0,003	
K-A(10)	0,015±0,003	
K-A(20)	0,019±0,004	

*P=0.03 DM ile DM-A(10) arasi fark var; +P=0.002 K-A(10) ile DM-A(10) arasi fark var



Çizim 4.18. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda ovaryum dokusu GSH (Glutation) seviyelerinin karşılaştırılması.

P=0.002 ** DM-A(10) grubu ile kıyaslandığında; P=0.03 * DM-A(10) grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

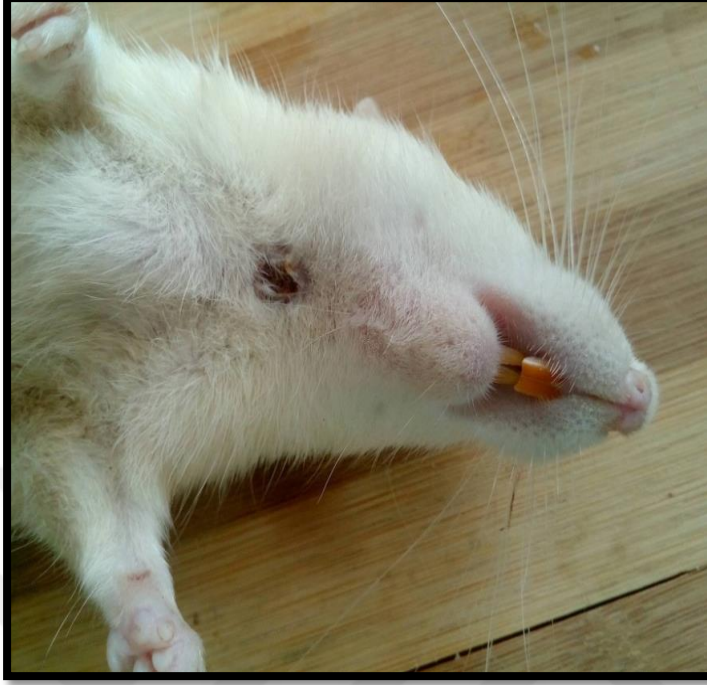
4.4. Hayvanların Makroskopik Değişimleri

Hayvanlar sakrifiye edilmeden önce ve sonra vücutta ve organlarda bazı makroskopik değişiklikler fark edildi (Çizim 4.19-4.22). Deneye aynı vücut ağırlaya alan, deney sonunda 28. günde sakrifiye edilmeden önce diyabet ve sağlıklı kontrol grubuna ait sıçanların dış görünüşlerinde farklılık gözlemlendi (Çizim 4.19). Kontrol grubu sıçanların görünümünün ve organlarının sağlıklı olduğu gözlemlendi. Diyabetli sıçanlarda ise boyun bölgesinde lezyon (Çizim 4.20), gastrointestinal sistemde megakolon benzeri makroskopik bulgu (Çizim 4.21), perikardiyumda sıvı birikmesi ve fibroz farklılaşma (Çizim 4.22) olarak gözlemlendi.



Çizim 4.19. Diyabet ve sağlıklı gruba ait iki sıçanın görünümü.

DM (solda) ve kontrol (sağda) grubu sıçanların deney sonunda 28. günde.



Çizim 4.20. DM-A(10) grubuna ait bir sıçanda boyun bölgesinde açık bir lezyon'un görünümü.



DM-A(20) grubu



DM-A(10) grubu

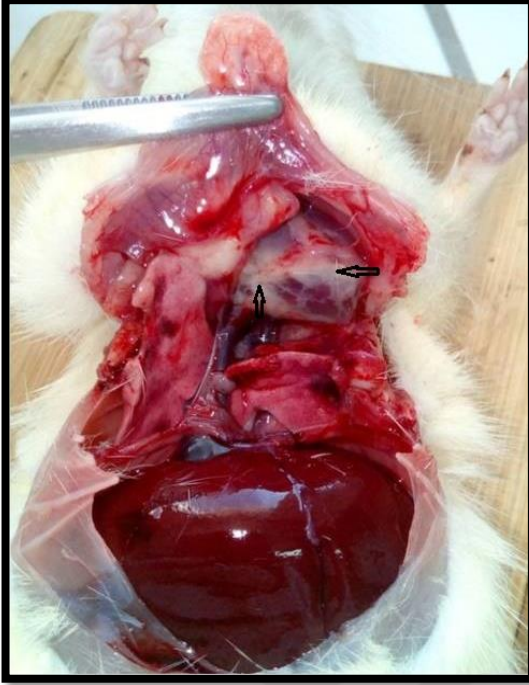


DM grubu

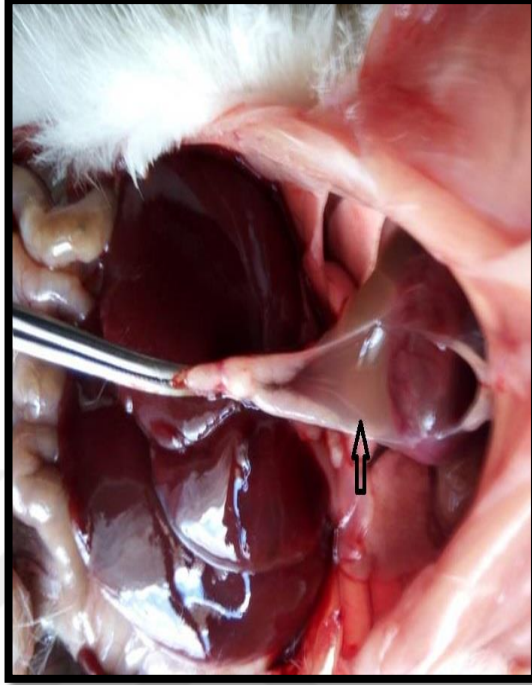


Kontrol grubu

Çizim 4.21. Diyabet gruplarına ait sıçanlarda GİS'in görünümü. Diyabet gruplarında ait sıçanların çoğu megakolon benzeri görüntü gözlemlendi, kontrol gruplarında benzeri değişiklikler ortaya çıkmadı.



Perikartta fibroz farklılaşma gözlemlendi



Perikart kesesi sıvı ile dolu.

Çizim 4.22. DM grubuna ait sıçanların kalpte gözlenen değişiklikler.

4.5. Işık Mikroskopi Bulguları

4.5.1. H&E Boyaması ve Folikül Sayımı Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ovaryumlarında bulunan foliküller morfolojik açıdan değerlendirildi. Tüm gruplarda folikülogenezin çeşitli evrelerinde olan foliküller gözlemlendi. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal stroma ve olgunlaşmanın farklı evrelerinde birçok folikül ile ovulasyonun göstergesi olan korpus luteum gözlemlendi. Granüloza hücreleri düzgün ve sıkı bir dizilim gösterdi. Teka hücreleri ise iğsi görünümlü normal dizilim gösterdi. Oosit ve oositi çevreleyen zona pellucidada herhangi bir dejenerasyon görülmedi (Çizim 4.23- 4.26).

DM grubuna ait ovaryum kesitlerinde büyük fibrotik alanlar ve genişlenmiş kan damarları fark edilildi (Çizim 4.27- 4.31).

DM-A(10) grubuna ait ovaryum kesitlerinde stromanın daha normal görünümde olduğu izlendi. Fibrotik alanlar diyabet grubuna göre daha az, genel görünümün normal bir yapıya olduğu görüldü (Çizim 4.32- 4.35).

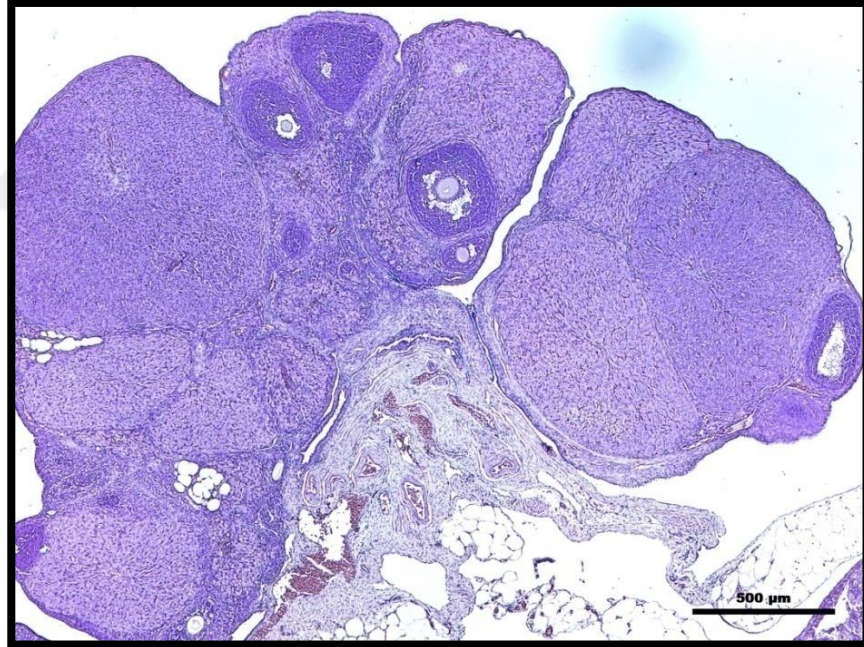
DM-A(20) grubuna ait ovaryum kesitlerinde fibrotik alanlar ve genişlenmiş kan damarları fark edildi. Dilate olan damarların dışına yayılan eritrositler ve korpus luteumlarda da kanama alanları fark edildi (Çizim 4.36- 4.40).

K-A(10) grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal stroma ve olgunlaşmanın farklı evrelerinde birçok folikül ile ovulasyonun göstergesi olan korpus luteum gözlemlendi (Çizim 4.41- 4.44).

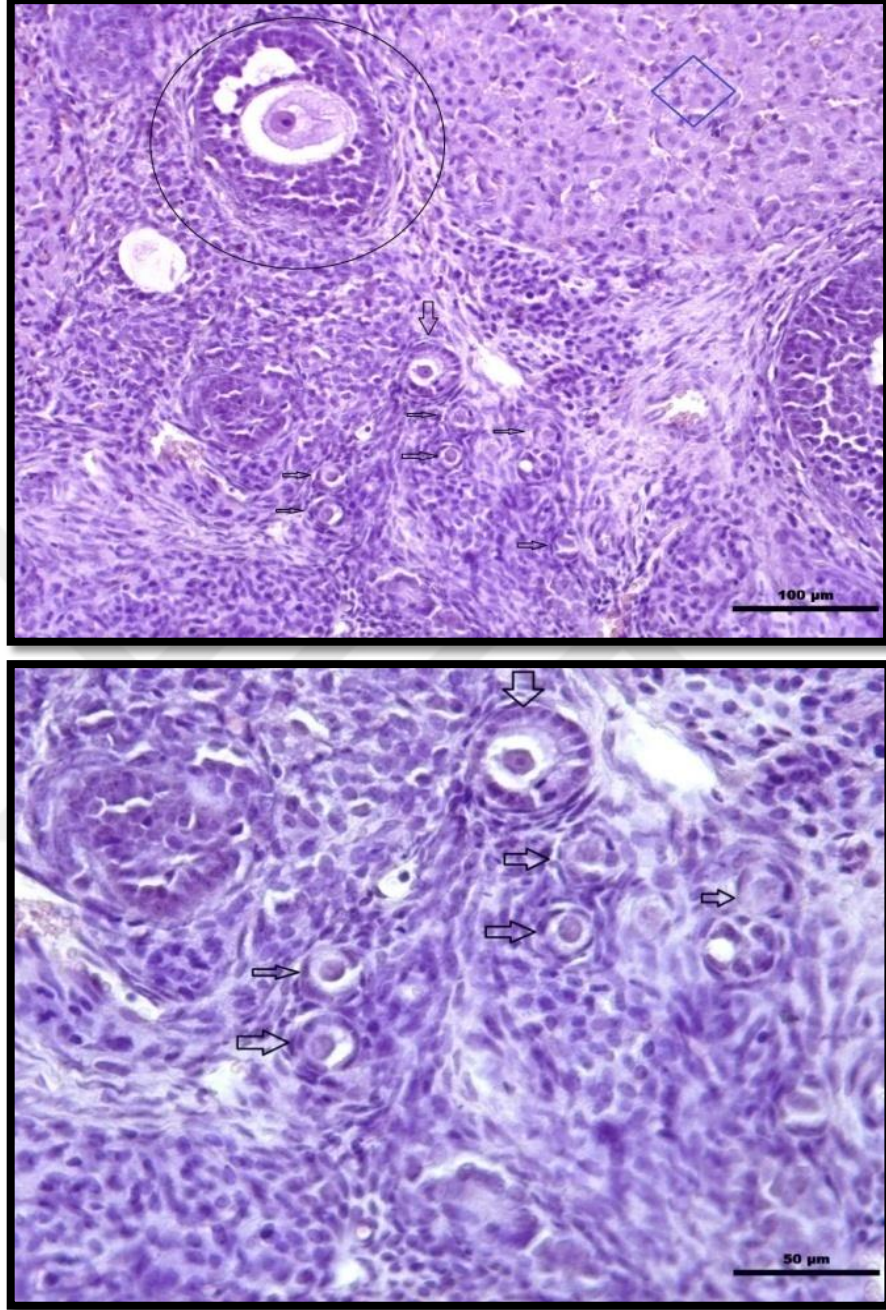
K-A(20) grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal stroma ve olgunlaşmanın farklı evrelerinde birçok folikül gözlemlendi. Stromada genişlemiş kan damarları, hemoraji ve yer yer fibrotik alanlar fark edildi (Çizim 4.45-4.48).

H&E Boyaması

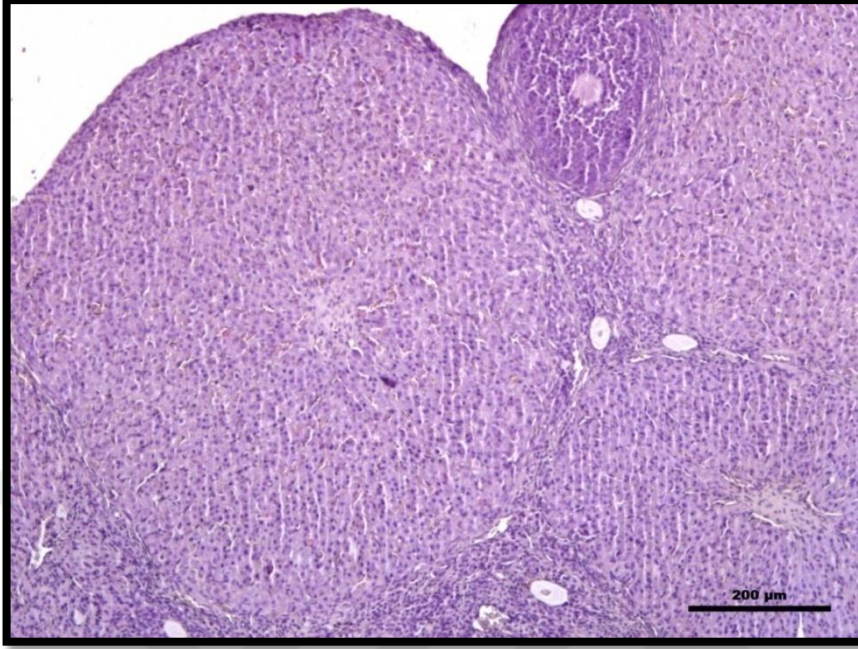
KONTROL gruba ait mikrograflar:



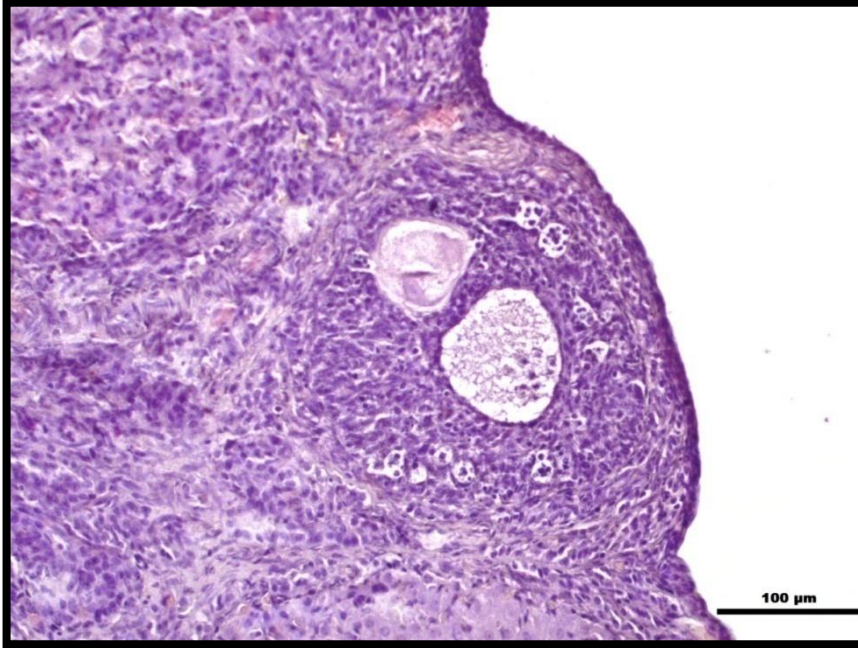
Çizim 4.23. Kontrol grubu, C seriden genel görünümü.



Çizim 4.24. Kontrol grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller (oklar- primordial foliküller; vertikal ok -primer folikül; dairenin içinde sekonder folikül; eşkenar dörtgen- korpus luteumu gösteriyor).

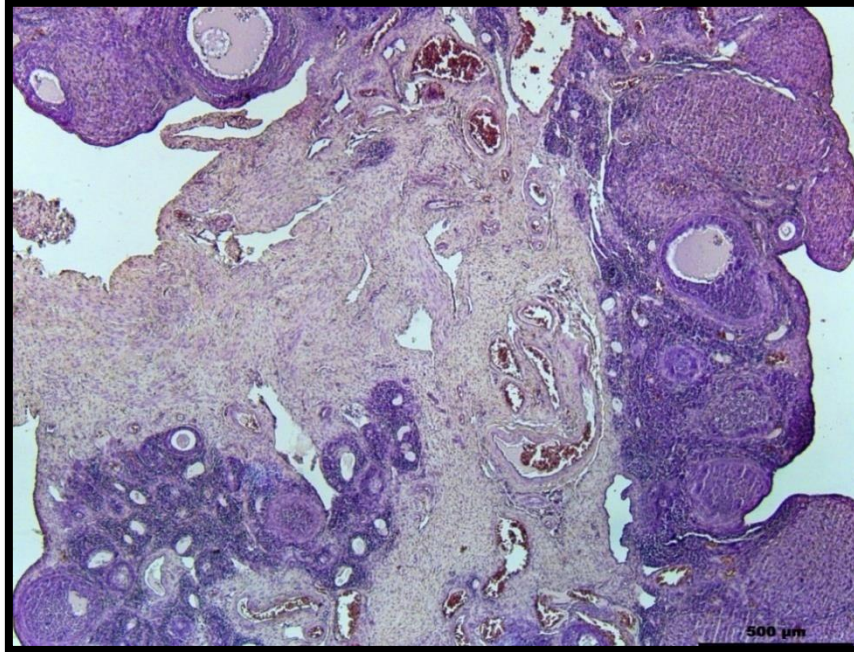
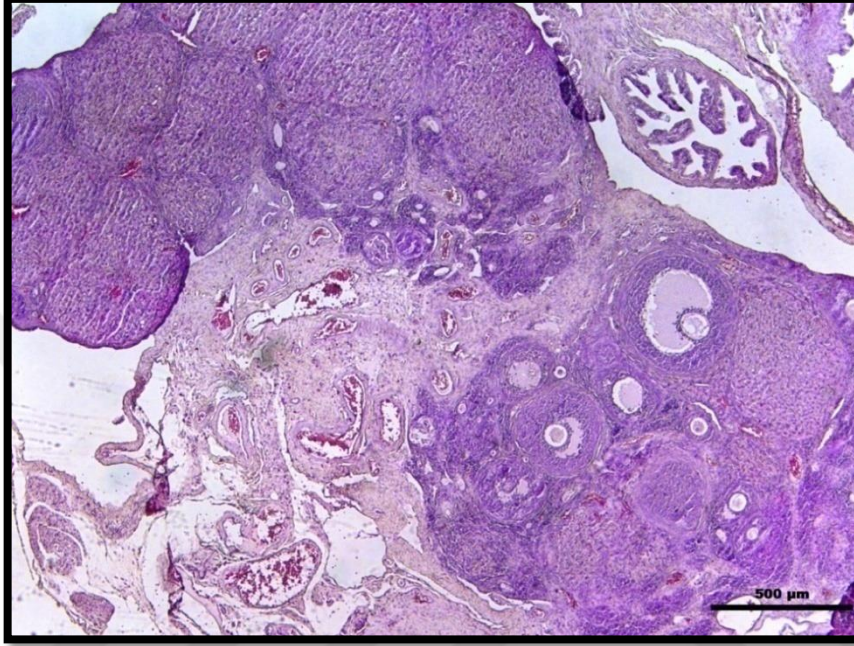


Çizim 4.25. Kontrol grubunda düzgün görümlü korpus luteum.

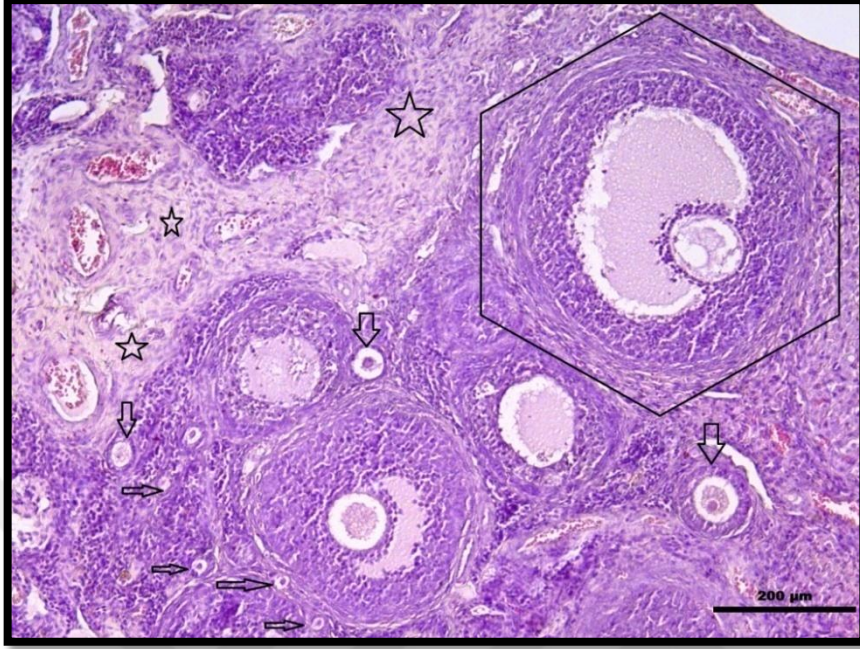


Çizim 4.26. Kontrol grubunda bir atretik folikülün görünümü.

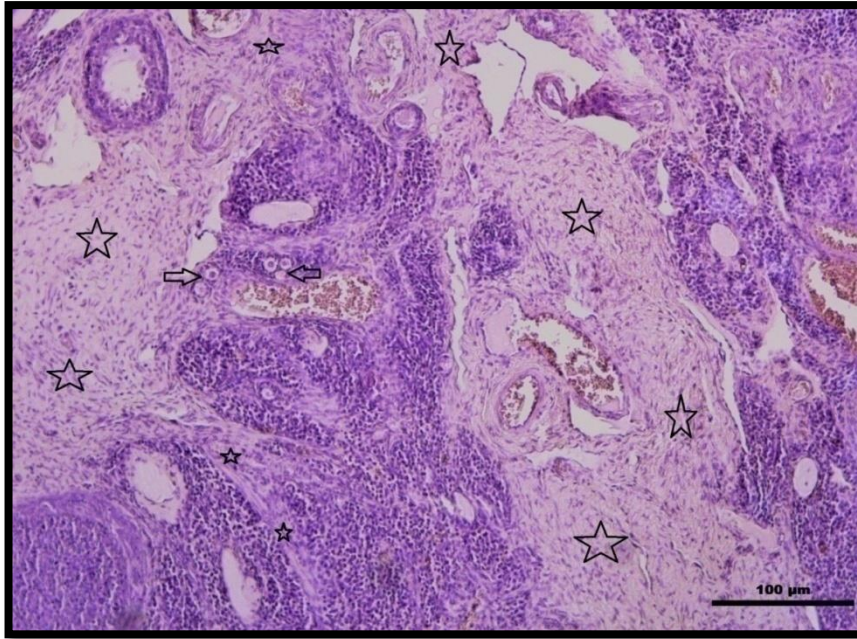
DM gruba ait mikrograflar:

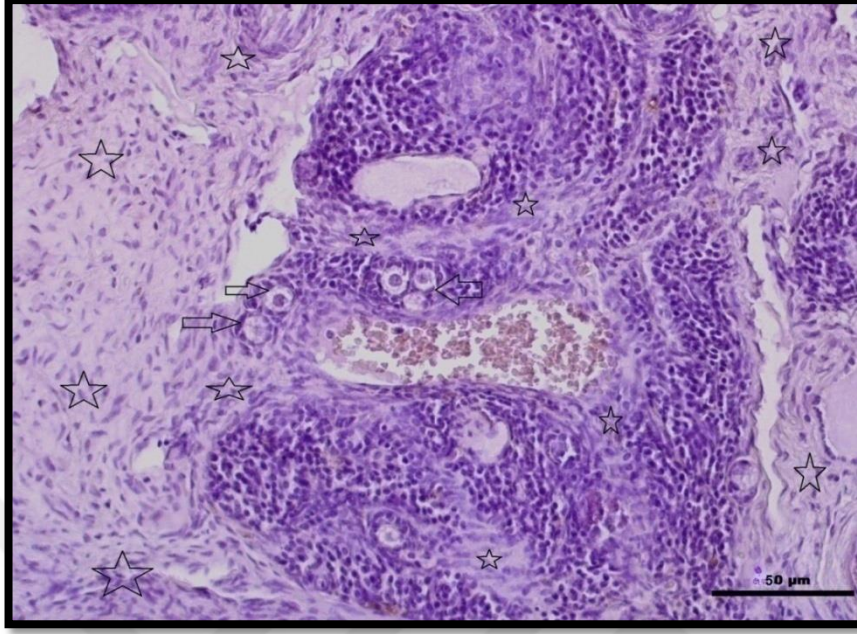


Çizim 4.27. DM grubun C seriden farklı örneklere ait genel görünümü. Büyük fibrotik alanlar ve genişlenmiş kan damarları fark ediliyor.

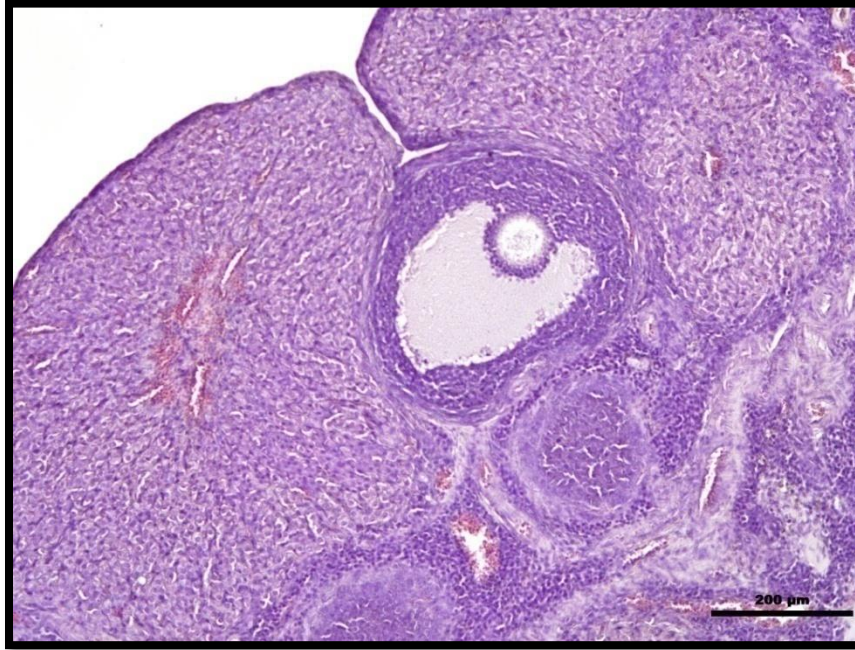


Çizim 4.28. DM grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.
(horizontal oklar- primordial foliküller; vertikal oklar- soldan-sağa unilaminar primer ve multilaminar primer folikül; onların ortasında sekonder folikül; altıgen içinde-Graaf follikül; yıldız- fibrotik alanları gösteriyor).

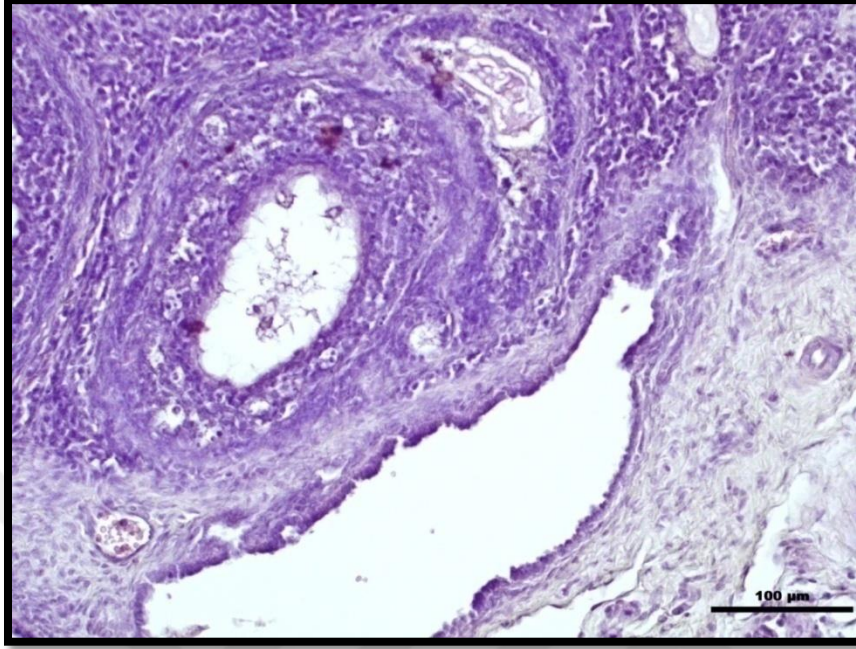




Çizim 4.29. DM grubunda folikülleri, geniş fibrotik alanlar ve genişlenmiş kan damarları. Horizontal oklar- primer foliküller, yıldızlar- fibrotik alanlar.

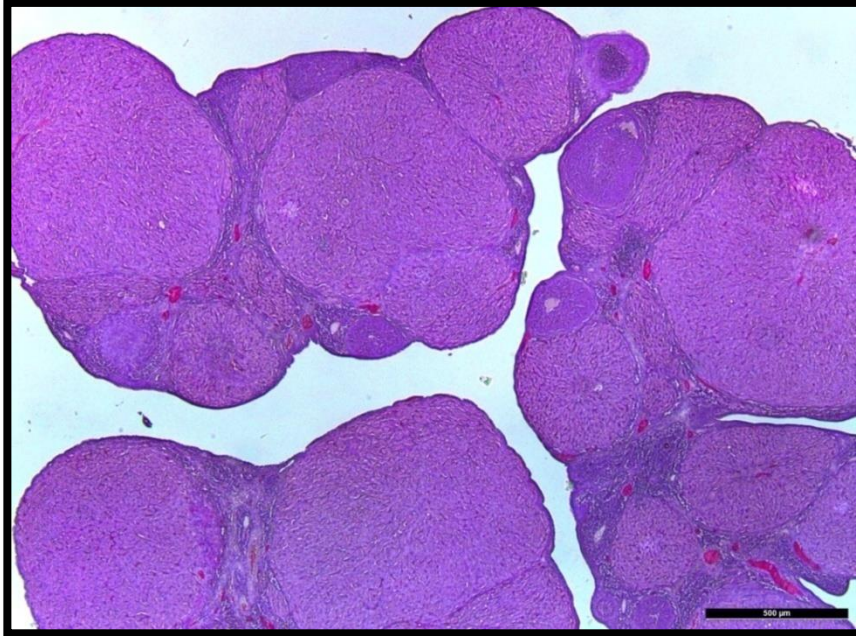


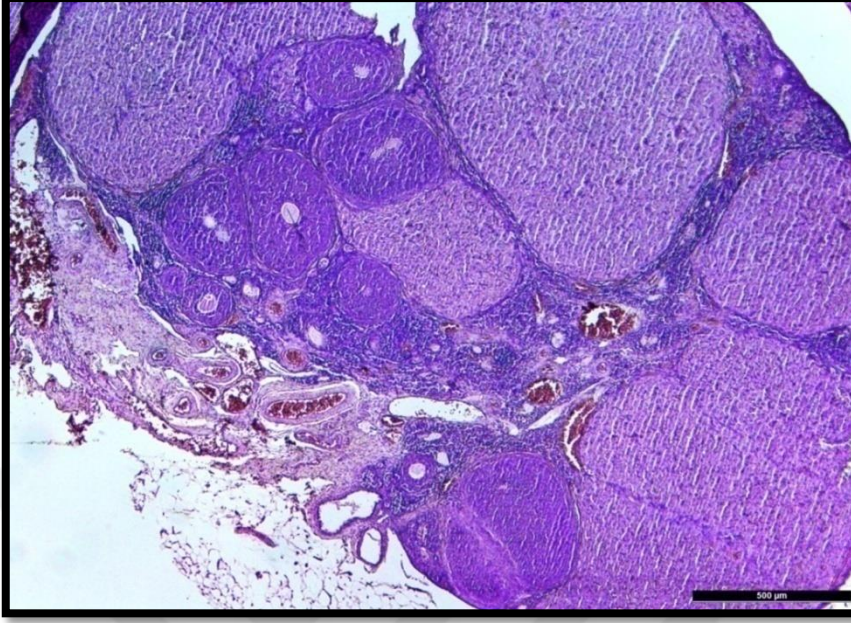
Çizim 4.30. DM grubunda tersiyer folikül ve korpus luteumlar.



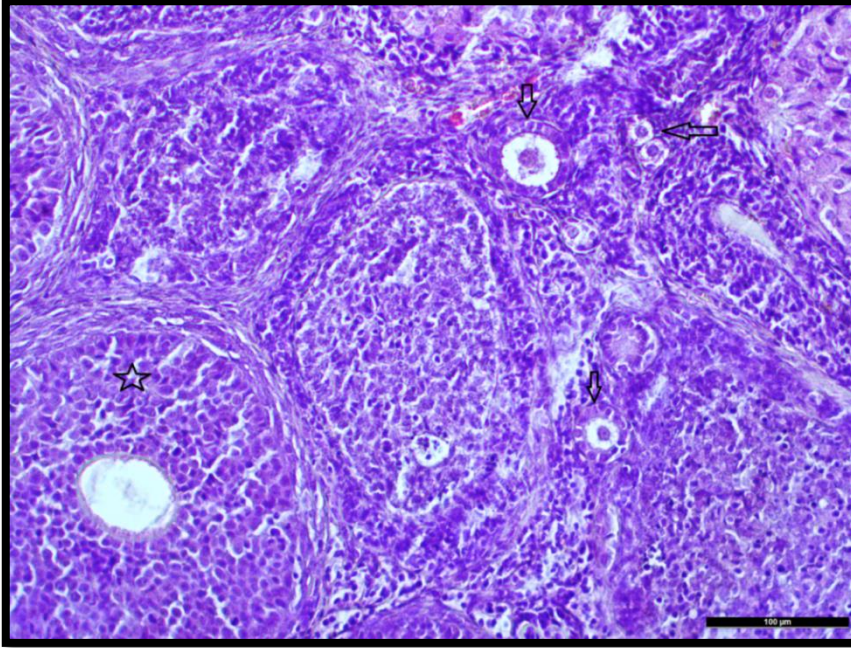
Çizim 4.31. DM grubunda atretik folikül görünümü.

DM-A(10) grubuna ait mikrograflar:

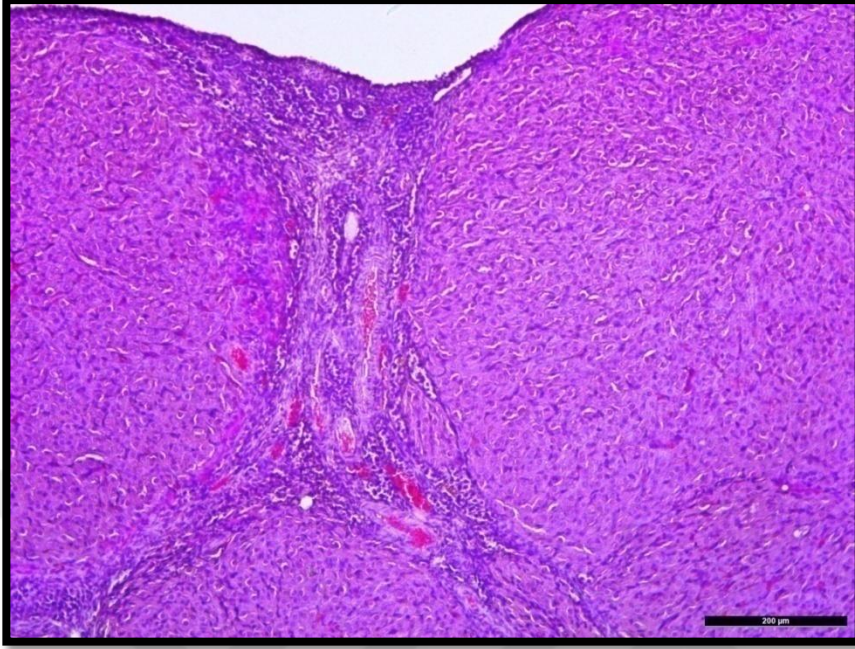




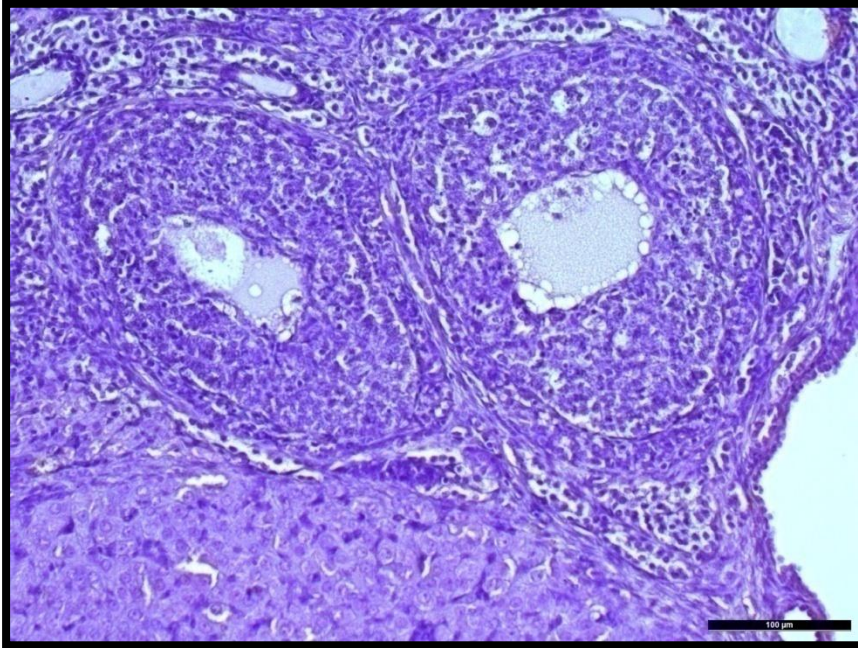
Çizim 4.32. DM-A(10) grubunda B ve C seriden ovaryumun genel histolojik görünümü.



Çizim 4.33. DM-A(10) grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller (horizontal ok-primordial foliküller; vertikal ok- unilaminar primer folikül; yıldız- multilaminar primer folikülü gösteriyor).

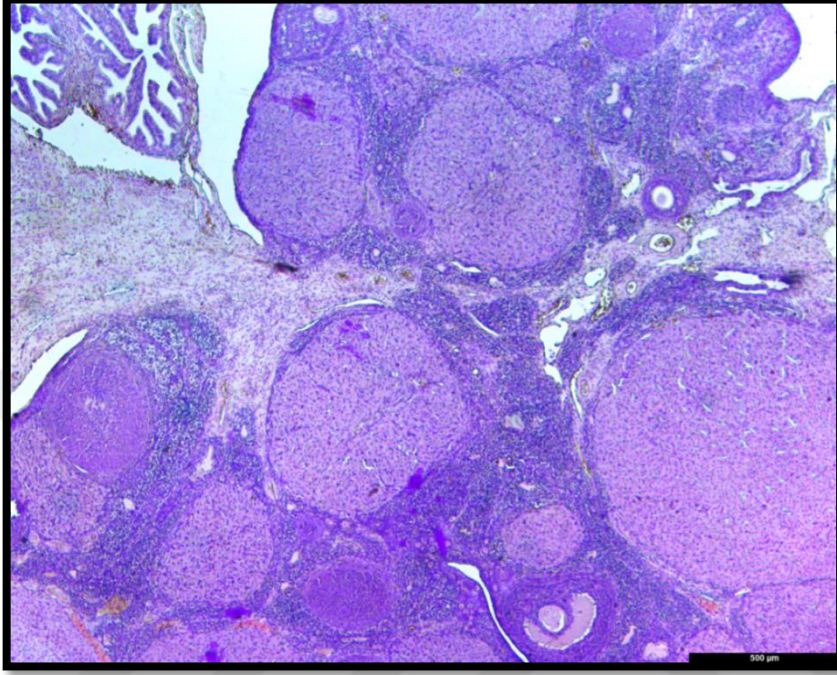


Çizim 4.34. DM-A(10) grubuna ait korpus luteumun görünümü.

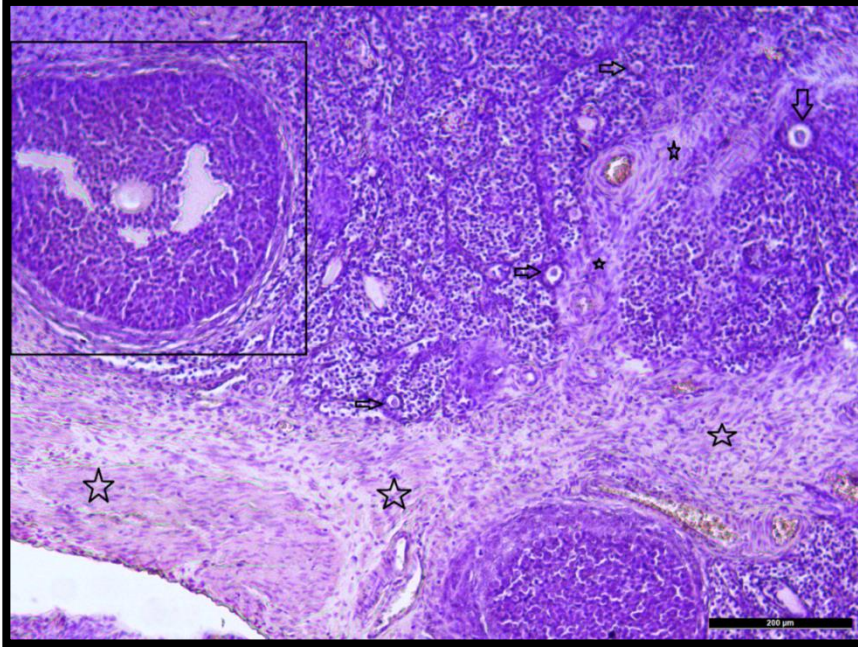


Çizim 4.35. DM-A(10) grubuna ait atretik foliküllerin görünümü.

DM-A(20) gruba ait mikrograflar:

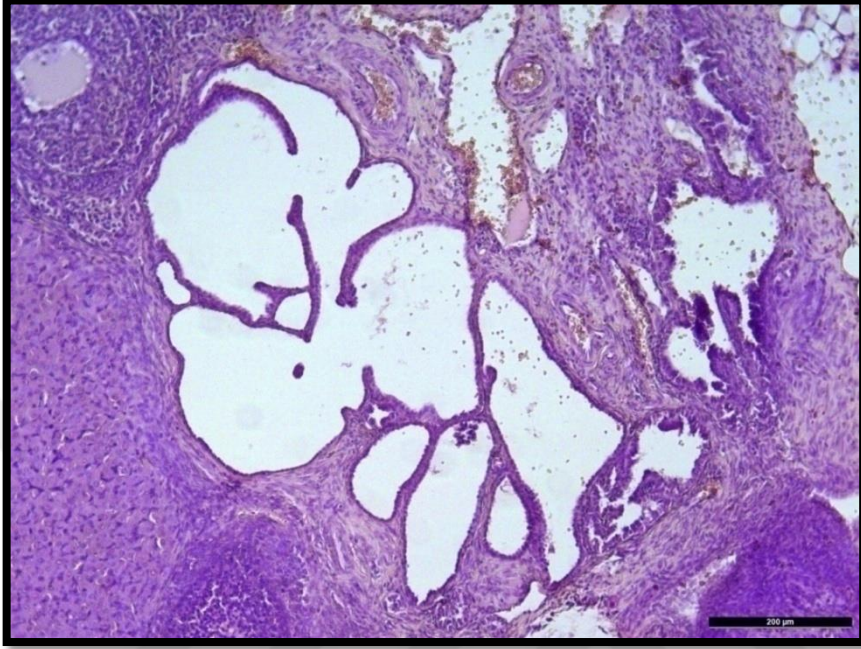


Çizim 4.36. DM-A(20) grubunda C seriden ovaryumun genel histolojik görünümü.

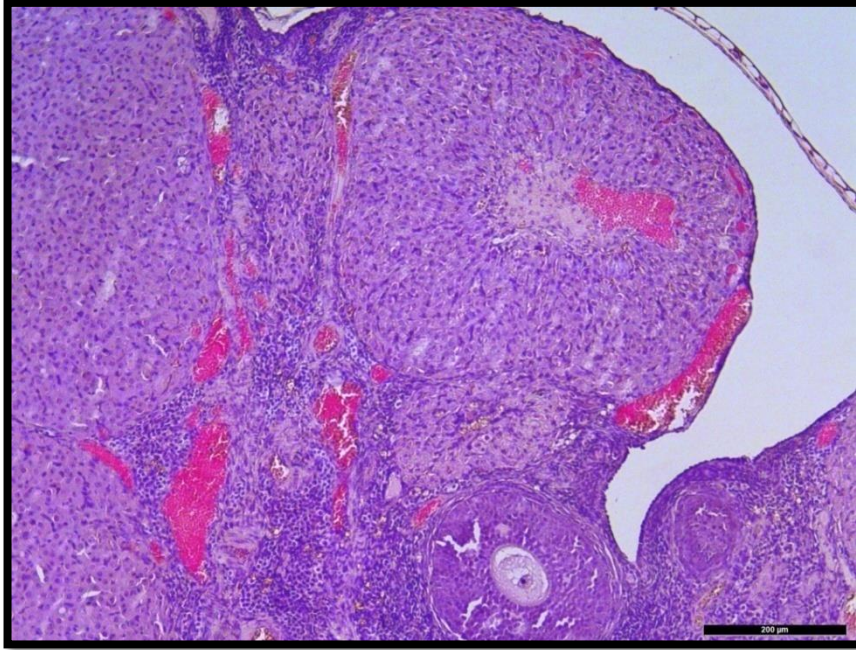


Çizim 4.37. DM-A(20) grubunda çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.

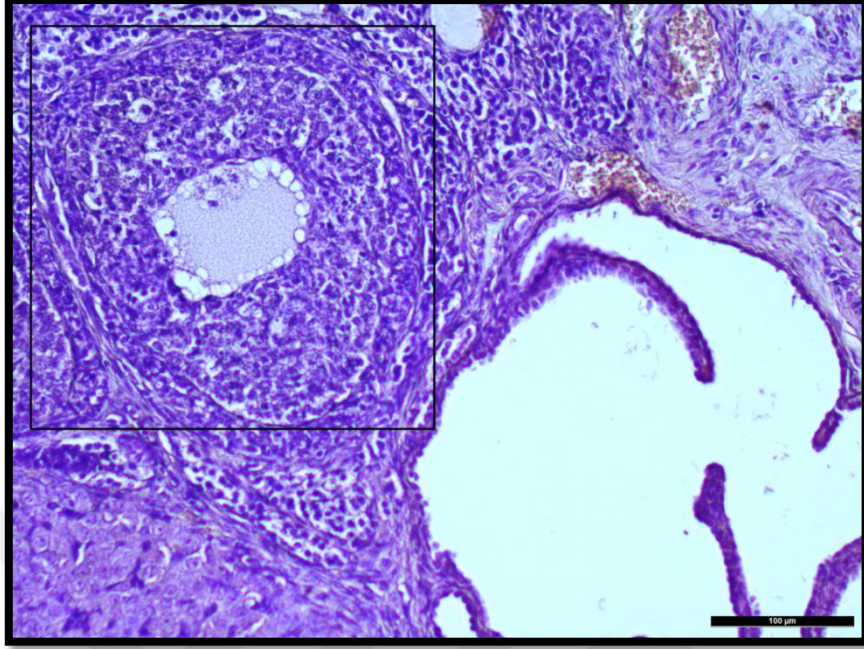
(horizontal oklar- primordiyal folikülleri; vertikal ok- primer folikülü; karenin içinde- sekonder folikülü; yıldızlar- fibrotik alanları gösteriyor).



Çizim 4.38. DM-A(20) grubunda ortaya çıkan kistik oluşumlar.

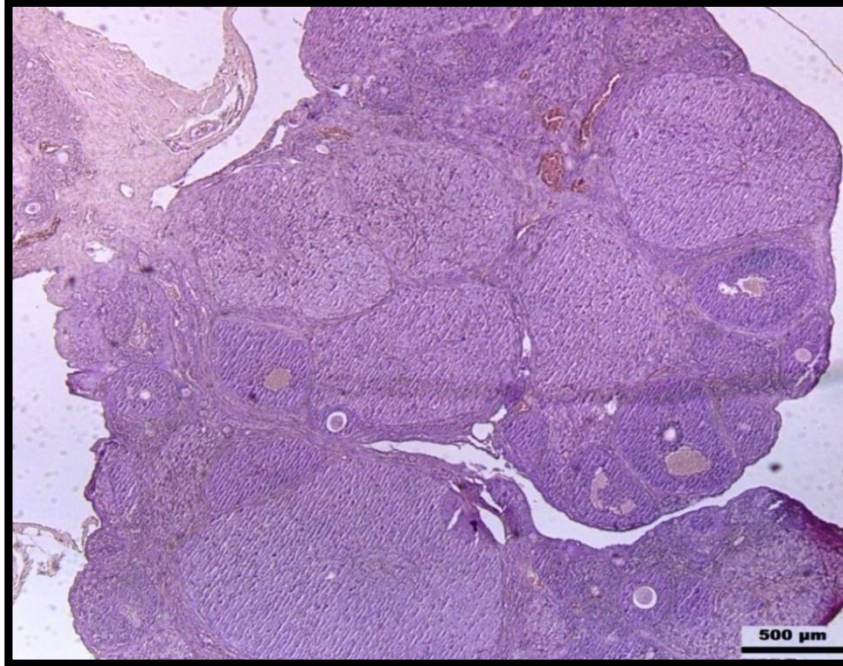


Çizim 4.39. DM-A(20) grubuna ait korpus luteumların görünümü.

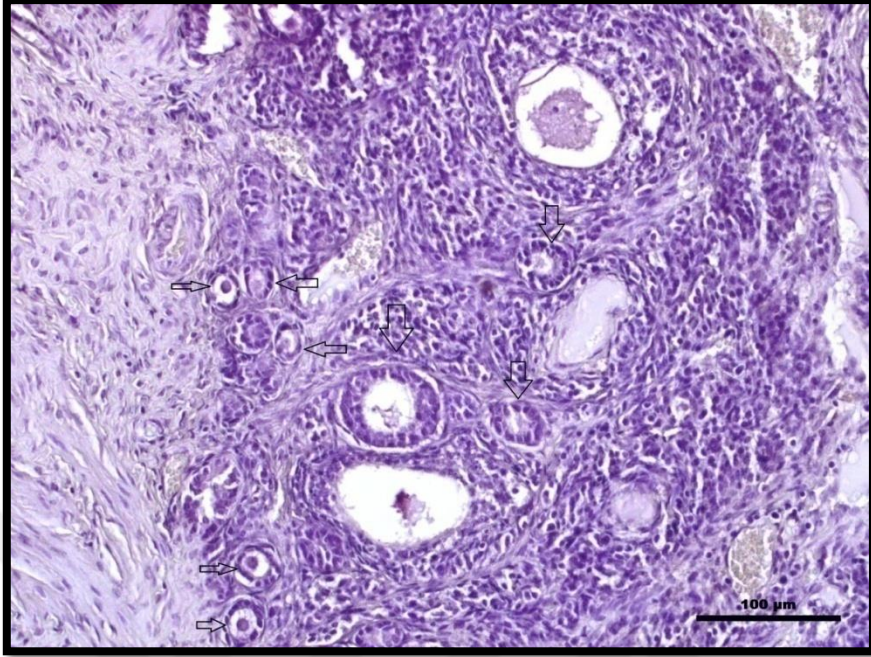


Çizim 4.40. DM-A(20) grubuna ait atretik folikülün görünümü.

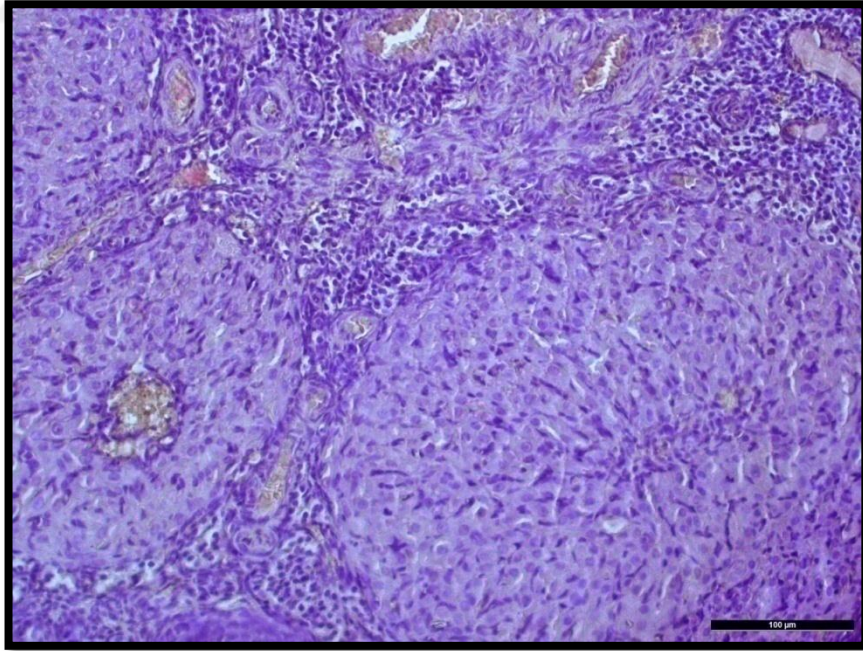
K-A(10) gruba ait mikrograflar:



Çizim 4.41. K-A(10) grubu ovaryumun genel histolojik görünümü.



Çizim 4.42. K-A(10) grubuna ait çeşitli gelişim evrelerinde olan foliküller.
(horizontal oklar-primordial folikülleri; vertikal oklar- primer folikülleri gösteriyor).

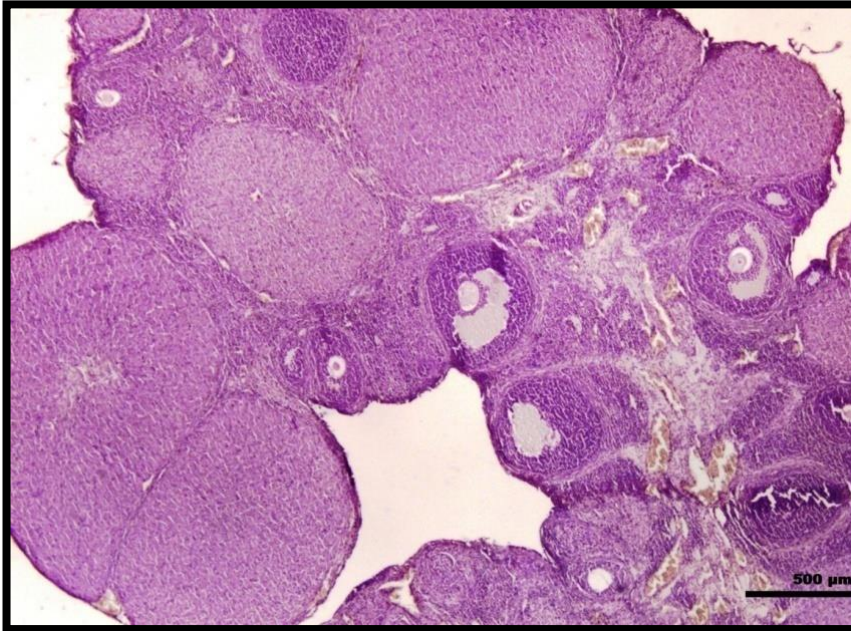


Çizim 4.43. K-A(10) grubuna ait düzgün görümlü korpus luteum.

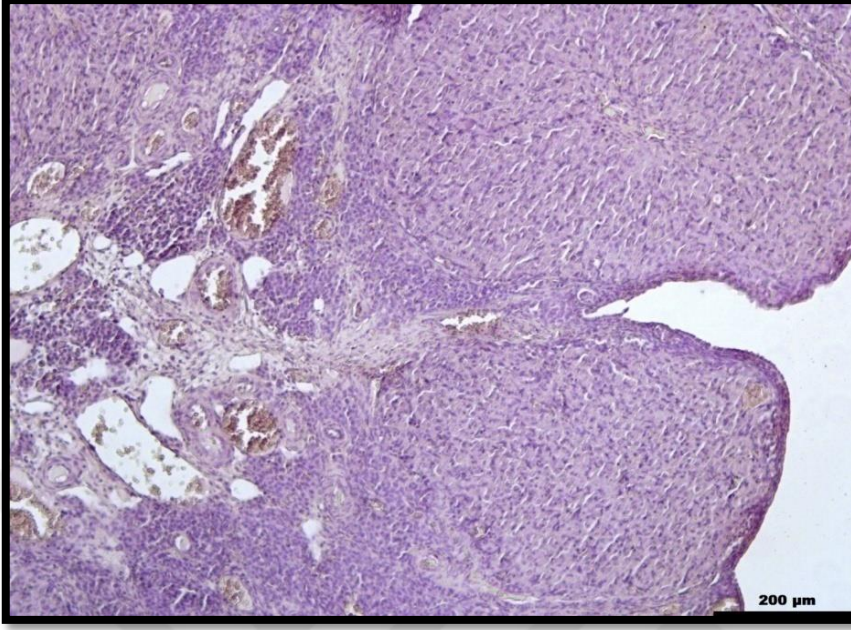


Çizim 4.44. K-A(10) grubuna ait bir atretik folikülün görünümü.

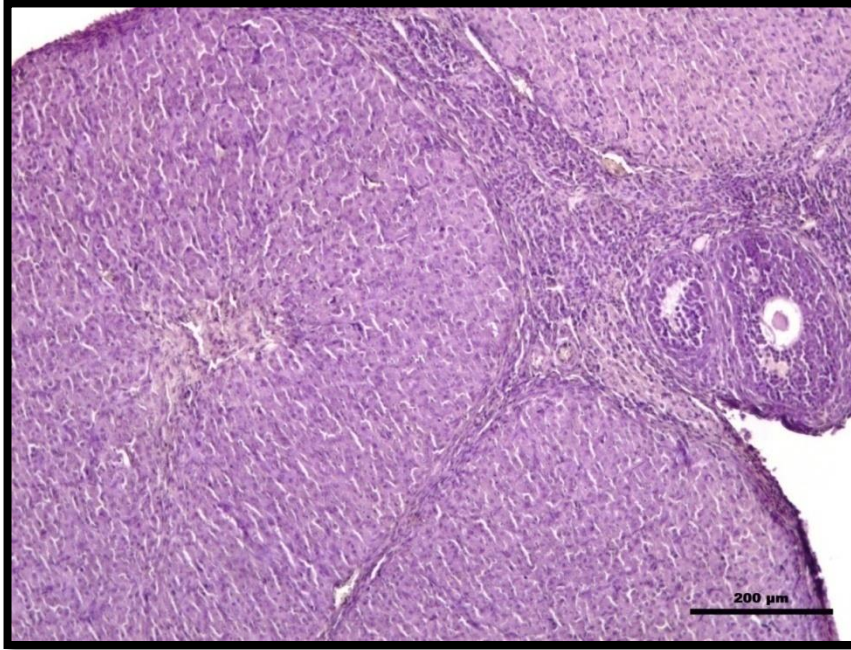
K-A(20) grubuna ait mikrograflar:



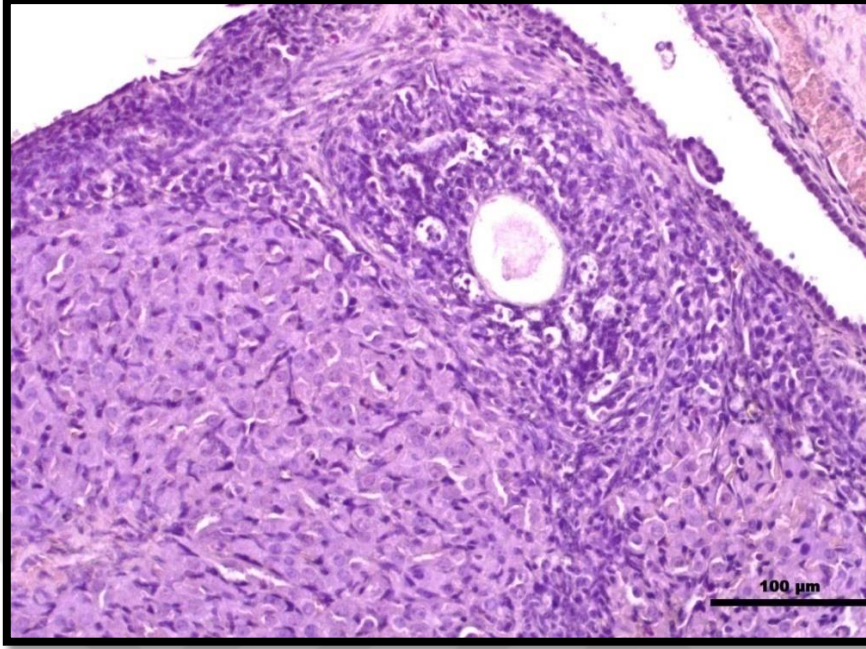
Çizim 4.45. K-A(20) grubu C seriden ovaryumun genel histolojik görünümü.



Çizim 4.46. K-A(20) grubunda genişlenmiş kan damarları ve hemoraji.



Çizim 4.47. K-A(20) grubuna ait düzgün görümlü korpus luteum.



Çizim 4.48. K-A(20) grubuna ait bir atretik folikülün görünümü.

Folikül Sayımı Bulguları

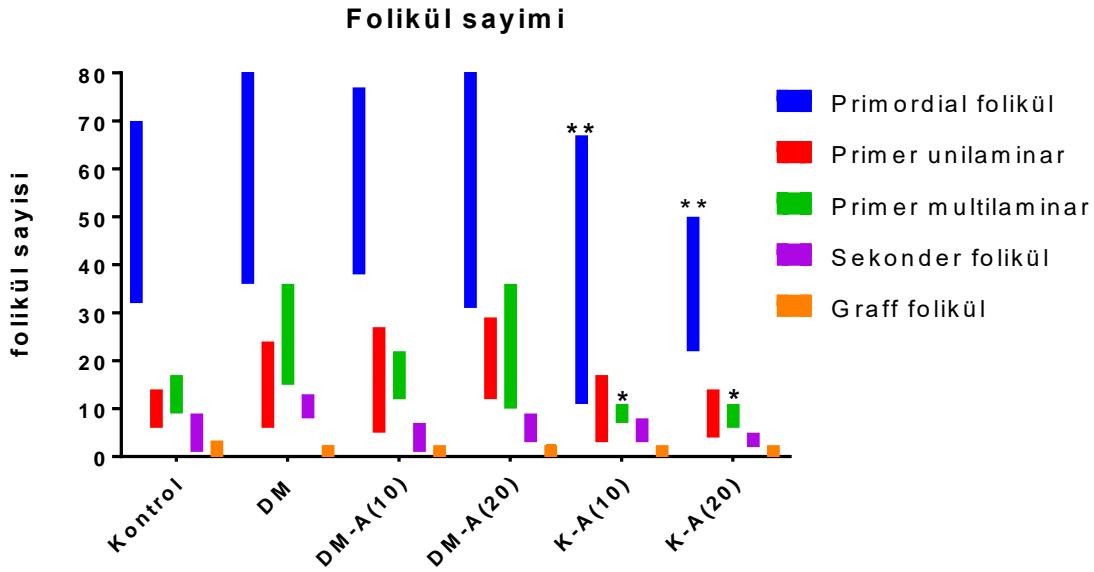
Farklı gruplardaki ışık mikroskopik bulgulara folikülerin ve oositlerin morfolojik değişiklikleri anlamlı bulunmadı. Folikül sayımlarında da Graaf ve sekonder folikülerde, gruplar arası önemli bir fark saptanmadı. En önemli fark primordial ve atretik folikülerde gözlemlendi. Diyabet grubunda, atretik foliküllerin sayısı istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıktı. Atorvastatin alan kontrol grupların ovaryumlarında, primordial foliküllerin sayıları çok düşüktü (Çizelge 4.17 ve Çizim 4.49.).

Çizelge 4.17. Kontrol, DM ve tedavi gruplarındaki primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder ve Graff foliküllerin sayıları.

(n=7)

Gruplar	primordiyal	p.unilaminar	p.multilaminar	sekonder	Graff	Sig.=P
Kontrol	56,14±12,90	11±3,05	12,86±2,8	5,57±2,93	1,28±0,48	<0,05*+
DM	59±14,82	16,28±6,18	23,57±6,4	10,14±1,57	1,28±0,75	
DM-A(10)	60,86±16,53	16,28±8,06	16,28±3,6	3,86±2,26	1±0,57	
DM-A(20)	51,57±22,0	18,28±5,82	16,57±8,9	7,14±2,11	1,42±0,78	
K-A(10)	36±22,97*	8,86±5,01	8,57±1,51 ⁺	5,28±1,79	0,71±0,75	
K-A(20)	33,29±10,86*	7,71±3,95	9,142±1,7 ⁺	3,71±1,11	1±0,81	

*P<0.05 K-A(10) ve K-A(20), DM grubu ile kıyaslandığında; ⁺ P<0.0001 K-A(10) ve K-A(20)- Kontrol, DM ve DM-A(10) grupları ile kıyaslandığında.



Çizim 4.49. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder ve Graff foliküllerin karşılaştırılması.

P<0.0001 ** Kontrol, DM ve DM-A(10) grupları ile kıyaslandığında. P<0.05 * DM grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

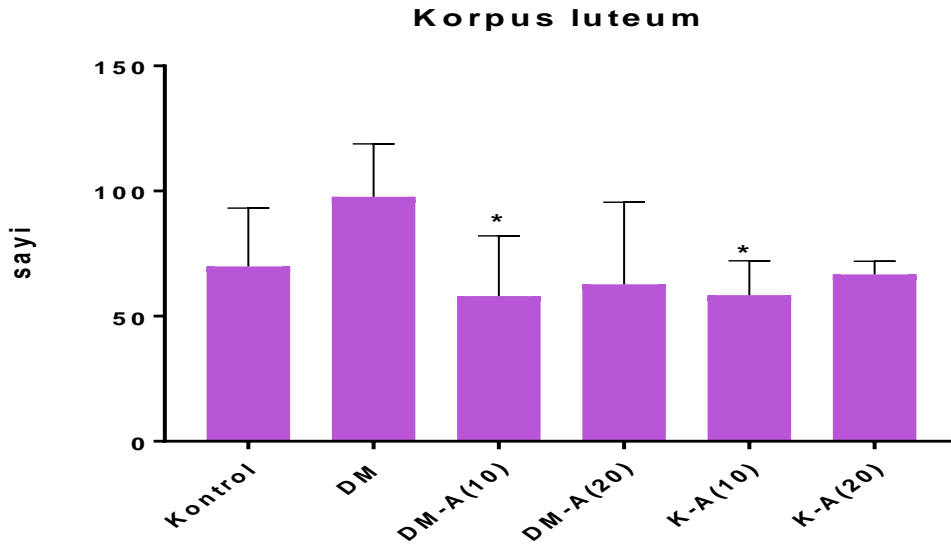
4.5.1.1. Korpus Luteum Sayımı

Korpus luteum sayısının Atorvastatin alan gruplarda daha düşük olduğu fark edildi. Göze çarpan sonuç DM grubunda yüksek olduğu ve 10mg/kg/g Atorvastatin alan gruplar ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Çizelge 4.18. ve Çizim 4.50.).

Çizelge 4.18. Kontrol, DM ve tedavi gruplarındaki korpus luteum sayılarının karşılaştırılması. (n=7)

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	69,86±23,33	<0,05*
DM	97,71±21,12	
DM-A(10)	58± 24,14	
DM-A(20)	62,71±32,86	
K-A(10)	58,43±13,72	
K-A(20)	66,71±5,25	

*p<0.05 DM, DM-A(10) ve K-A(10) gruplar arasında fark var.



Çizim 4.50. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda korpus luteum sayılarının karşılaştırılması. p<0.05 * DM grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

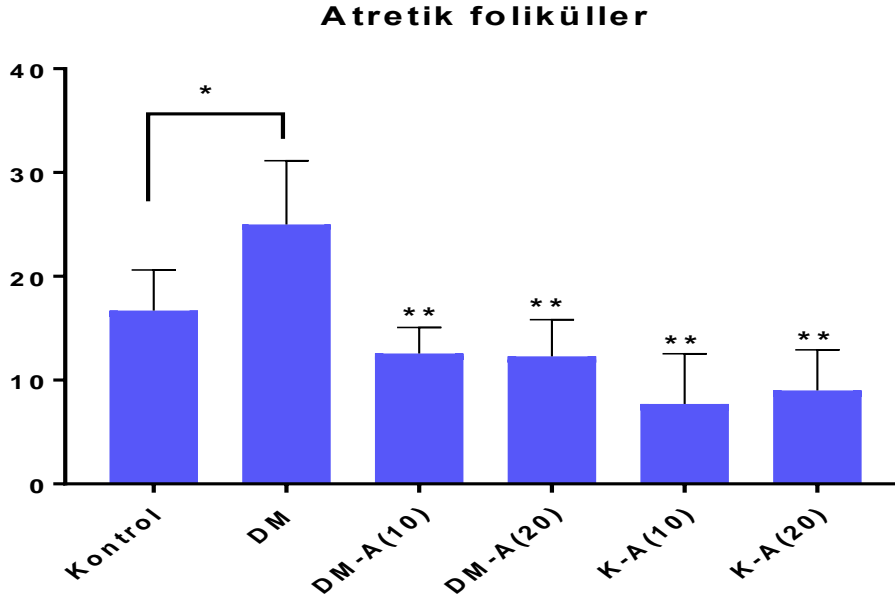
4.5.1.2. Atretik Foliküllerin Sayımı

DM grubunda atretik foliküllerin sayıları en yüksek bulundu. Atorvastatin alan diyabetik ve nondiyabetik gruplarda atretik foliküllerin sayısı daha düşüktü. DM grubu ile kıyaslandığında önemli bir istatistiksel fark saptandı ($p<0.0001$) (Çizelge 4.19. ve Çizim 4.51.).

Çizelge 4.19. Kontrol, DM ve tedavi gruplarındaki atretik folikül sayılarının karşılaştırılması

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	16,71±3,90	<0,05 ⁺
DM	25±6,14	
DM-A(10)	12,57± 2,50	
DM-A(20)	12,29±3,55	
K-A(10)	7,714±4,82	
K-A(20)	9±3,92	

* $p<0.05$ Kontrol ve DM grubu arasında fark var. ⁺ $p<0.0001$ DM-A(10), DM-A(20), K-A(10) ve K-A(20), DM grubu ile kıyaslandığında.



Çizim 4.51. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda atretik folikül sayılarının karşılaştırılması.

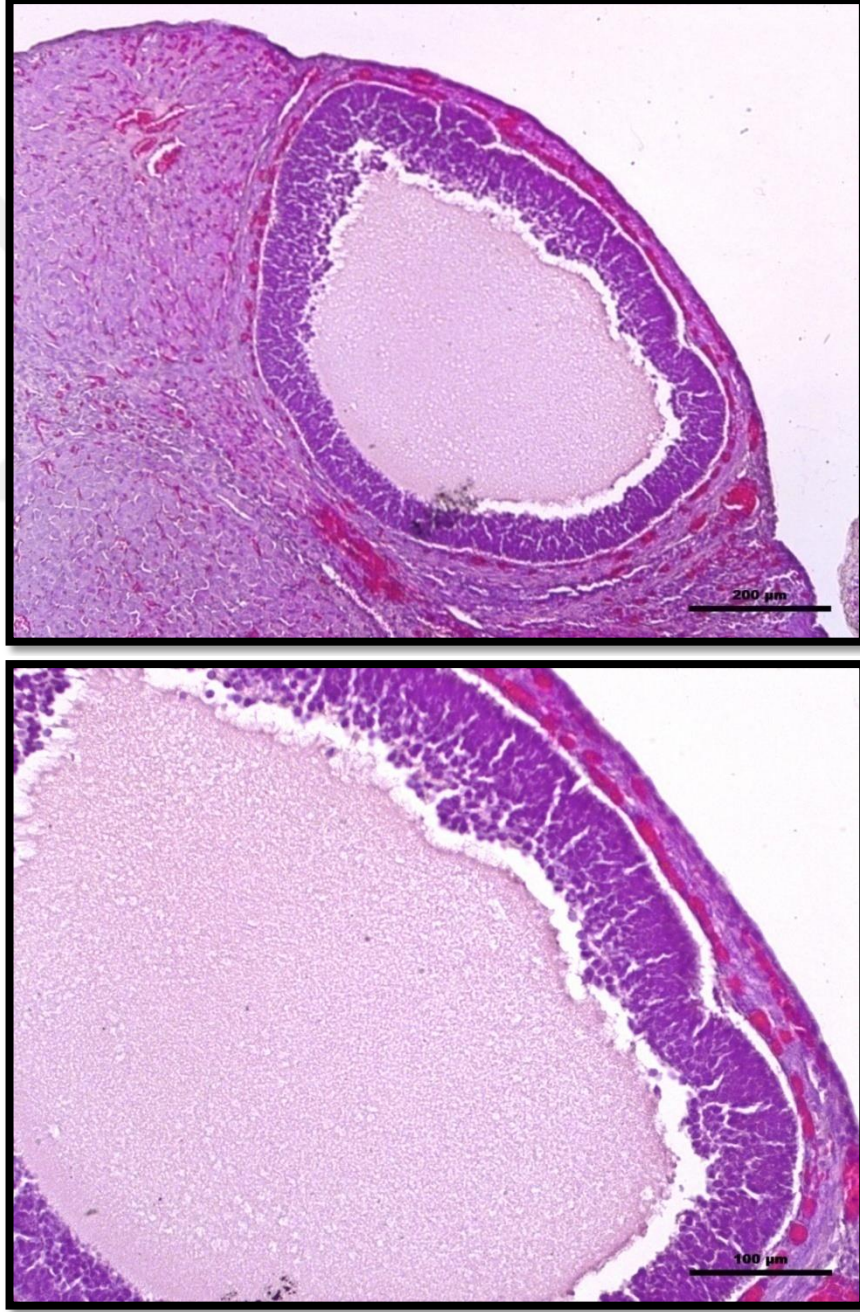
$p<0.0001$ ** DM grubu ile kıyaslandığında, $p<0.05$ * Kontrol ve DM grubu arasında fark var.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.5.1.3. Diğer Bulgular

EİB Epitelyal İnkluzyon Bezleri

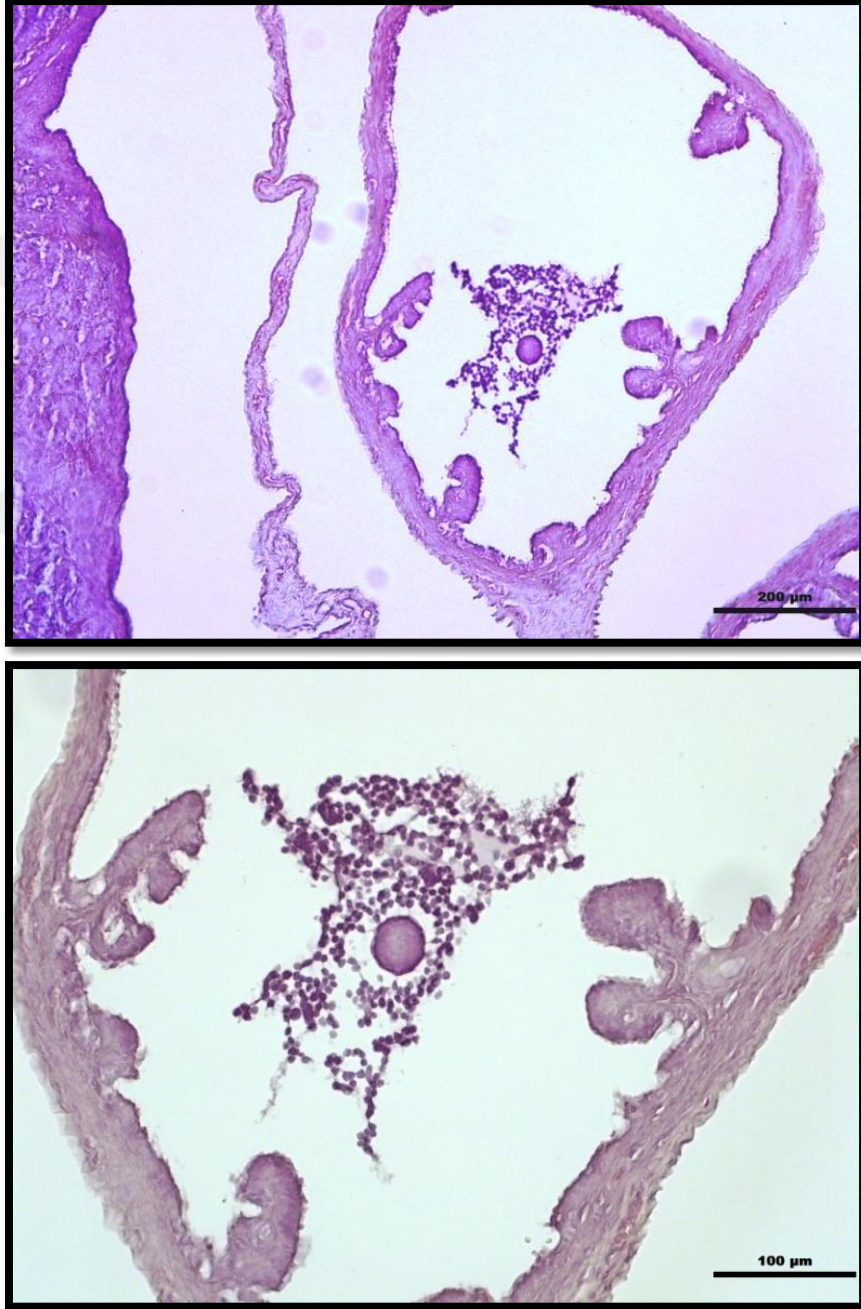
Kesitler ışık mikroskobunda incelenirken ve folikülerin sayımı yapıldığında, epitelyal inkluzyon bezleri fark edildi. Her kesitte değil, fakat her grupta gözlendi (Çizim 4.52).



Çizim 4.52. Kontrol grubuna ait EİB (Epitelyal İnkluzyon Bezi)'in görünümü

Tuba Uterinada Oosit

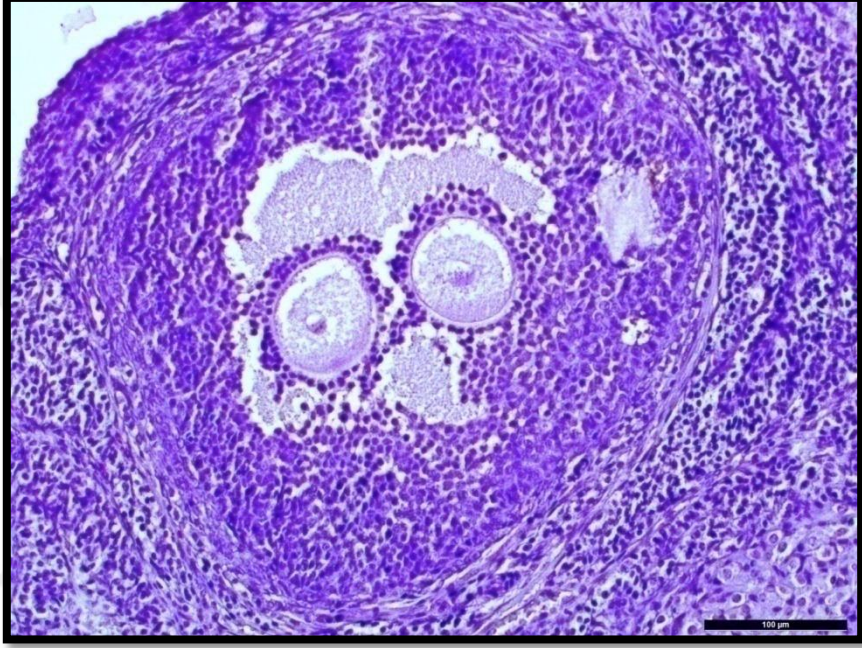
DM grubu H&E ile boyanmış kesitler incelenirken, tuba uterina lümeninde etrafındaki granüloza hücreleri ile beraber bir oosit fark edildi. Bu oosit, tuba uterinanın ampulla bölgesinde izlendiğinden zamanlama olarak hemen ovulasyon sonrası olduğu düşünüldü (Çizim 4.53).



Çizim 4.53. DM grubunda oosit ve korona radiata hücreleri görünümü.

Çift Oositli Folikül

DM-A(20) grubuna ait H&E kesitler incelenirken iki oositi olan bir sekonder folikül izlendi. İkiz bebek oluşumu için etken olarak kabul edilen çift oosit gözlemlenerek farklı bir tecrübe elde edildi (Çizim 4.54.).



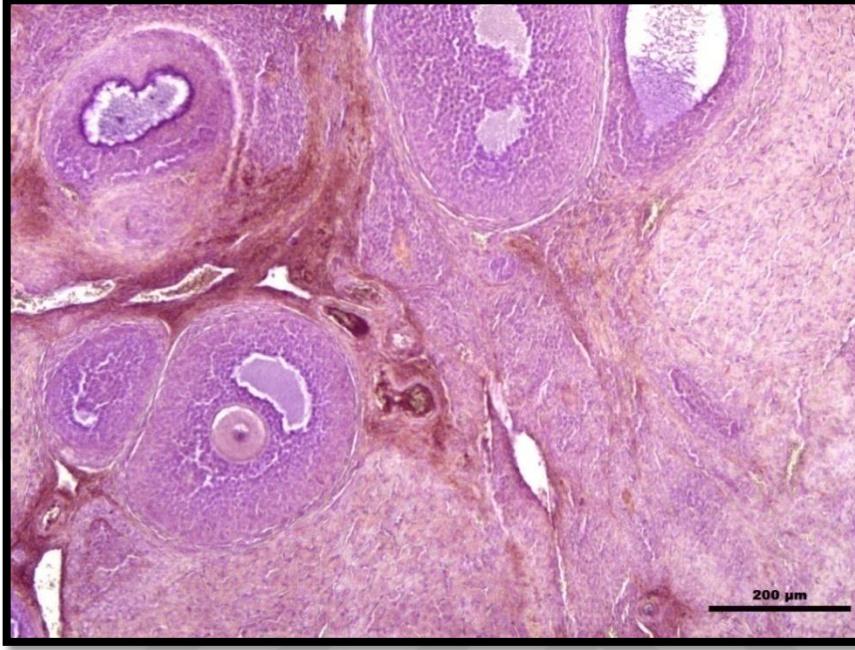
Çizim 4.54. DM-A(20) grubunda iki oositli folikülün görünümü.

4.5.2 İmmünohistokimya Bulguları.

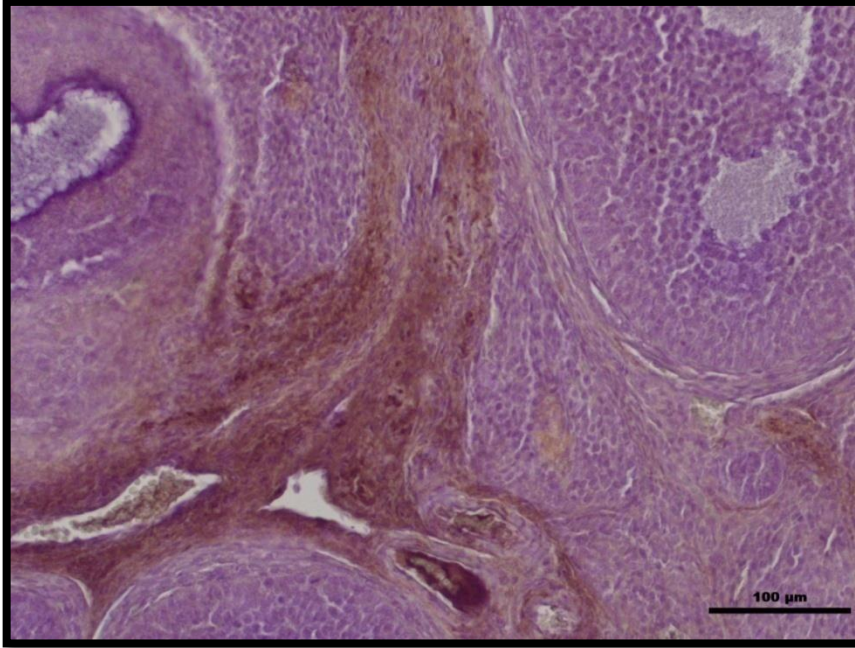
4.5.2.1. TGF- β İşaretleme

TGF- β , foliküller arası alanlarda eksprese oldu (Çizim 4.55 - 4.68), granuloza hücreleri ve oositler boyanmadı. TGF- β ekspresyonu; hilus bölgesinde, damarların etrafında daha güçlü gözlemlendi. Ovaryum dokusuna ait kesitlerde TGF- β ekspresyonun kuantifikasyonu yaptığımız zaman DM-A(20) grubunda en yüksek ekspresyona sahip olduğunu (Çizim 4.63 - 4.64) ve sonra DM grubunda da güçlü bir ekspresyon gösterdiğini tespit ettik (Çizim 4.58- 4.60). Diğer gruplarda kontrole göre ekspresyon daha azdı.

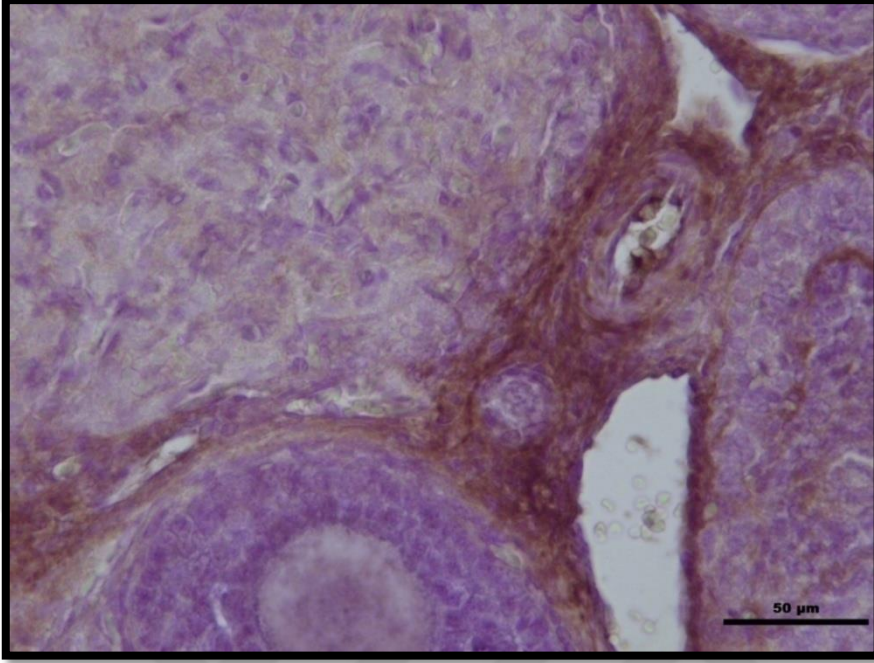
Kontrol grubuna ait mikrograflar:



Çizim 4.55. Kontrol grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.

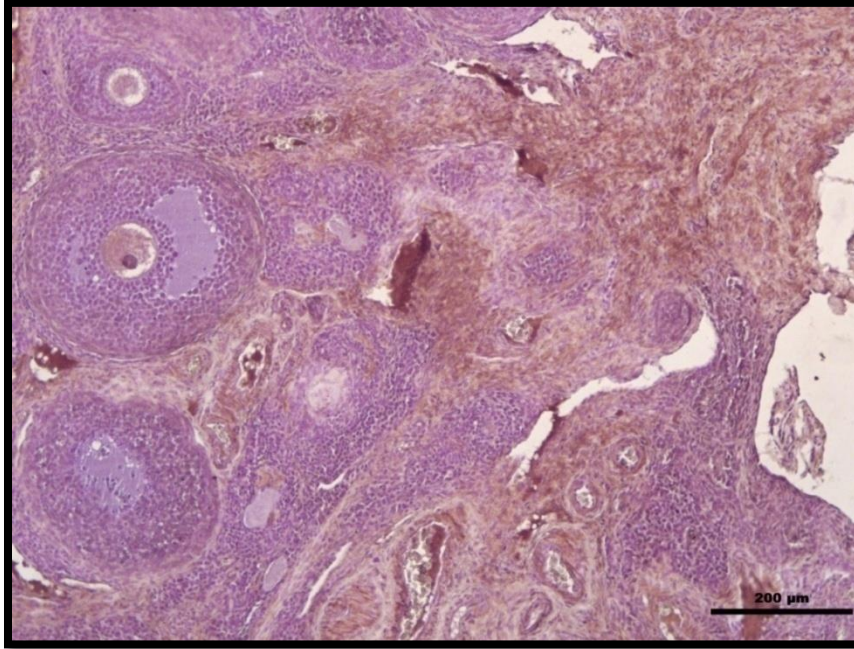


Çizim 4.56. Kontrol grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X

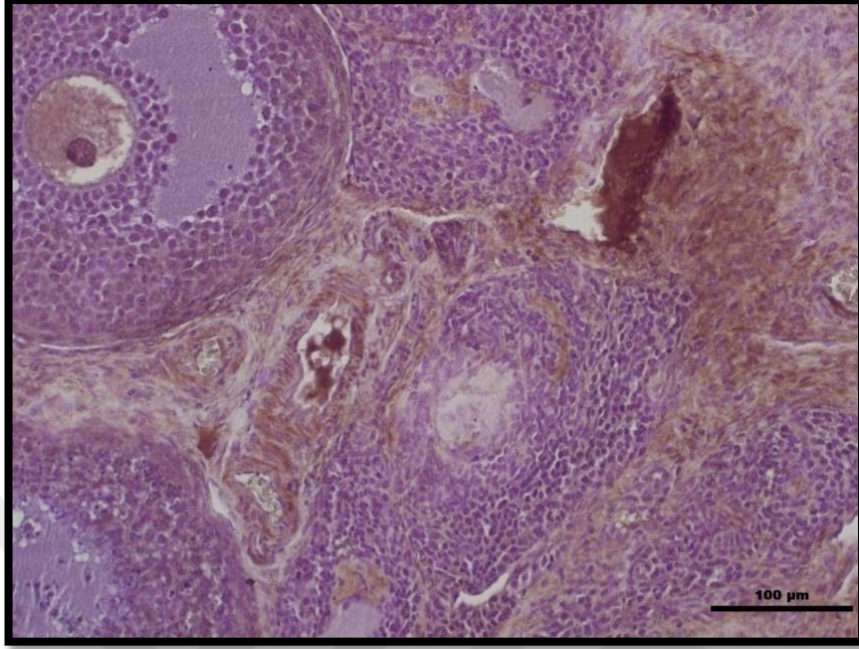


Çizim 4.57. Kontrol grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 40X

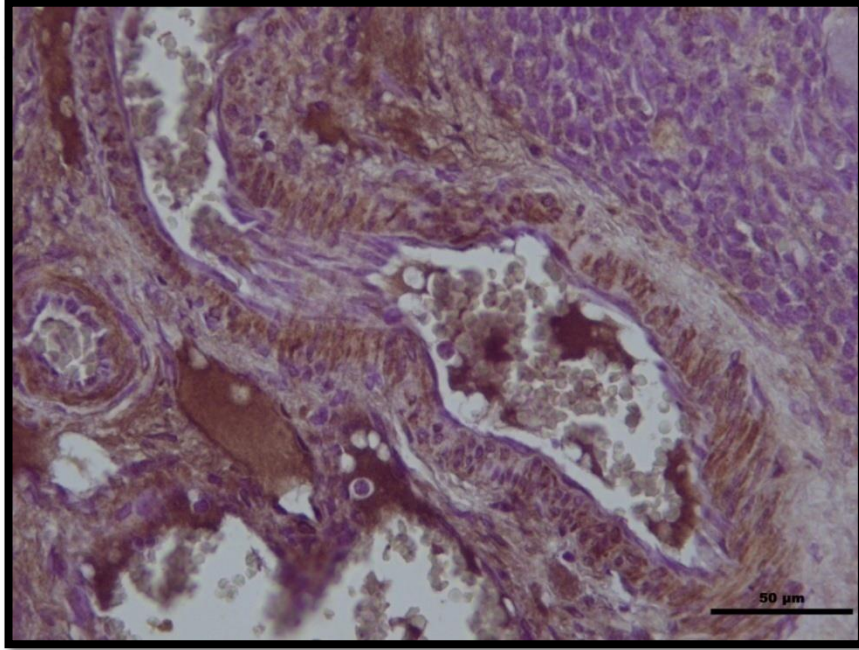
DM grubuna ait mikrograflar:



Çizim 4.58. DM grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.

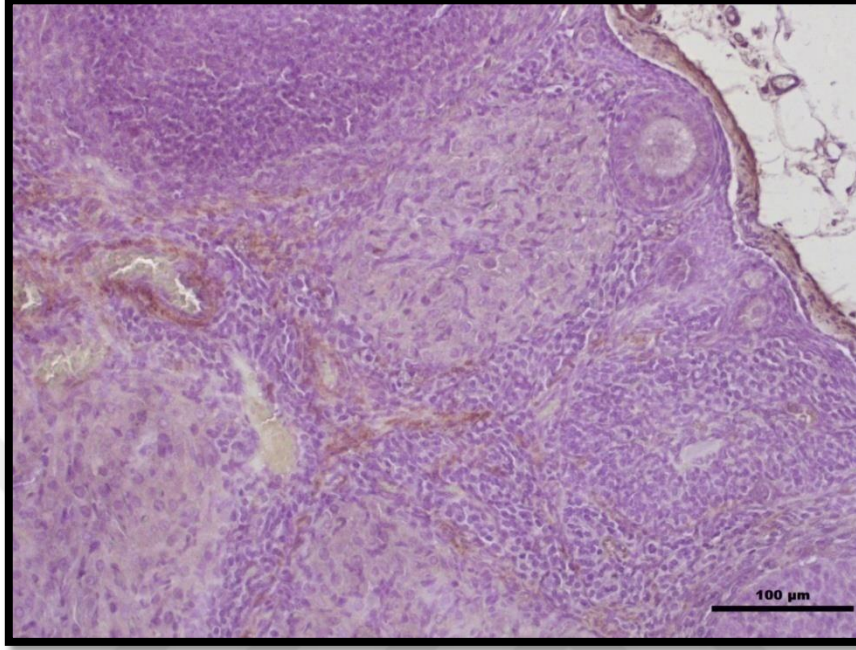


Çizim 4.59. DM grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.

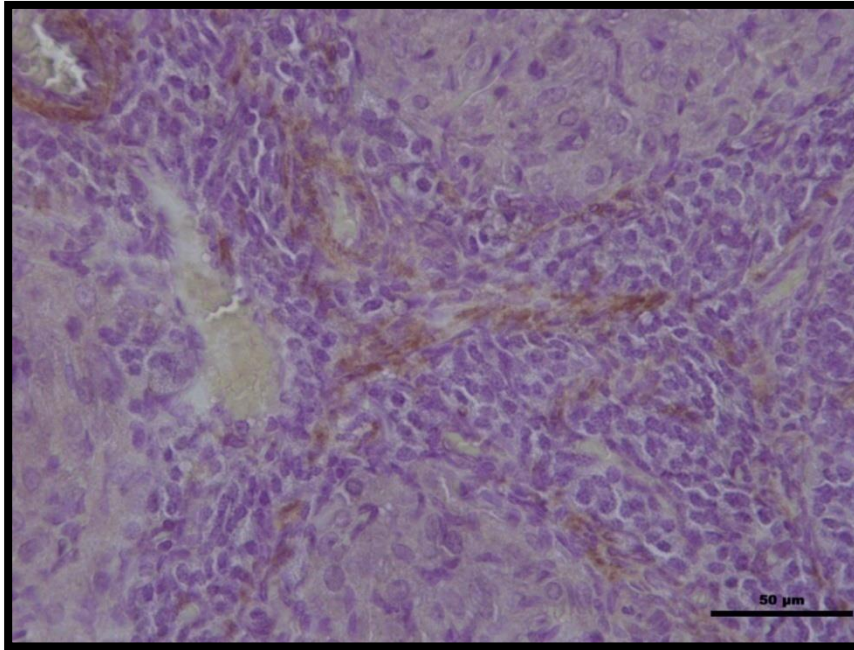


Çizim 4.60. DM grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 40X.

DM-A(10) grubuna ait mikrograflar

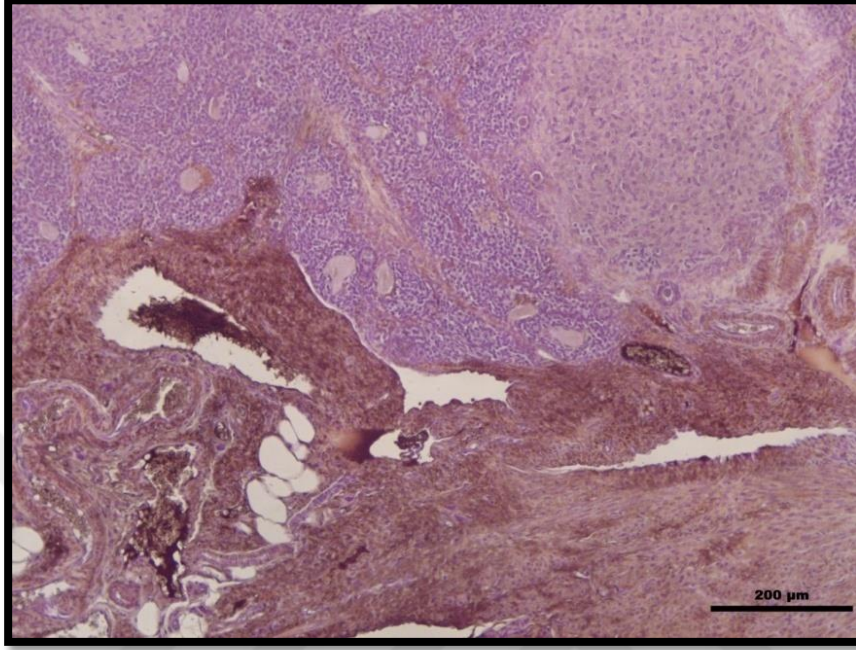


Çizim 4.61. DM-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X

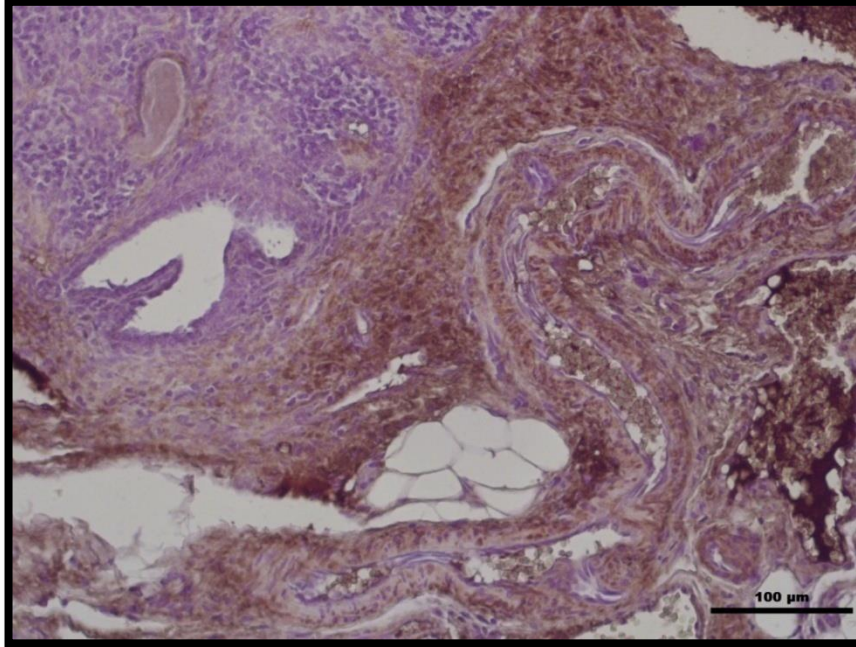


Çizim 4.62. DM-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 40X.

DM-A(20) grubuna ait mikrograflar

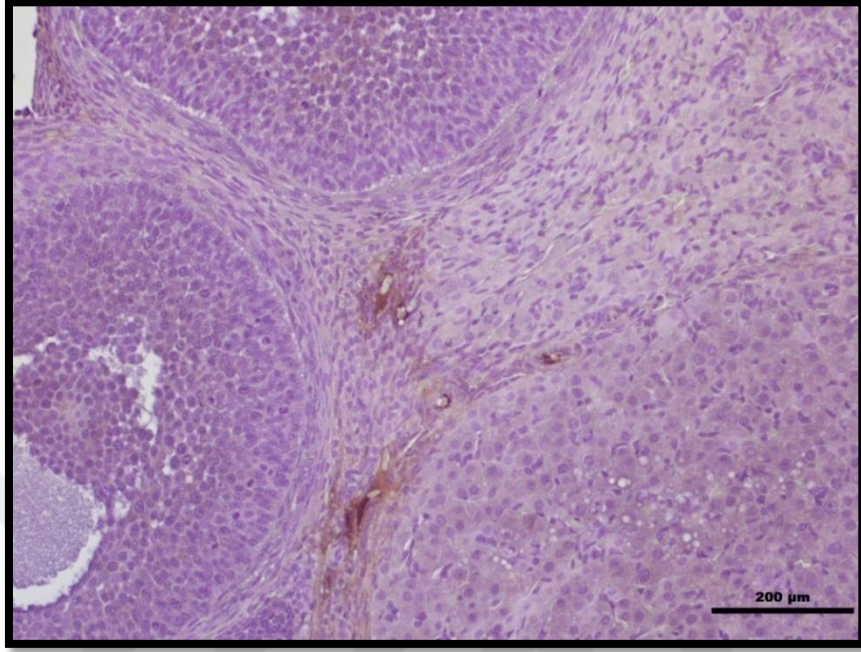


Çizim 4.63. DM-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.

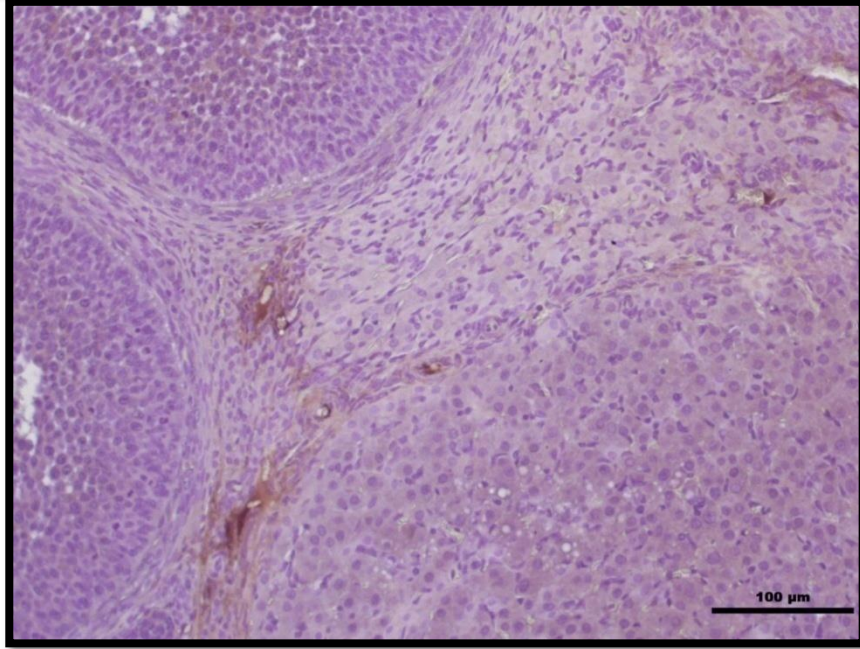


Çizim 4.64. DM-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.

K-A(10) grubuna ait mikrograflar:

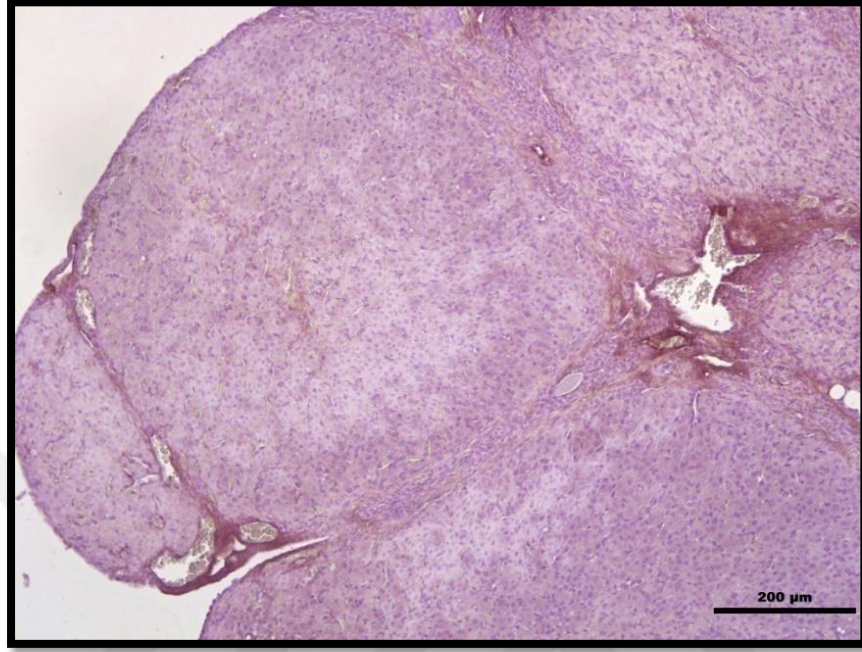


Çizim 4.65. K-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.

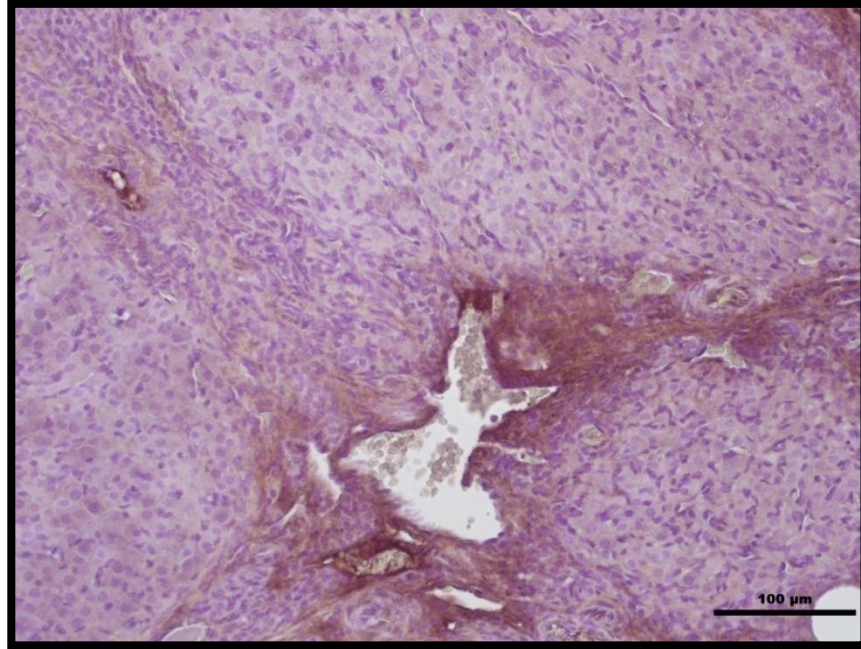


Çizim 4.66. K-A (10) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.

K-A(20) grubuna ait mikrograflar:



Çizim 4.67. K-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 10X.

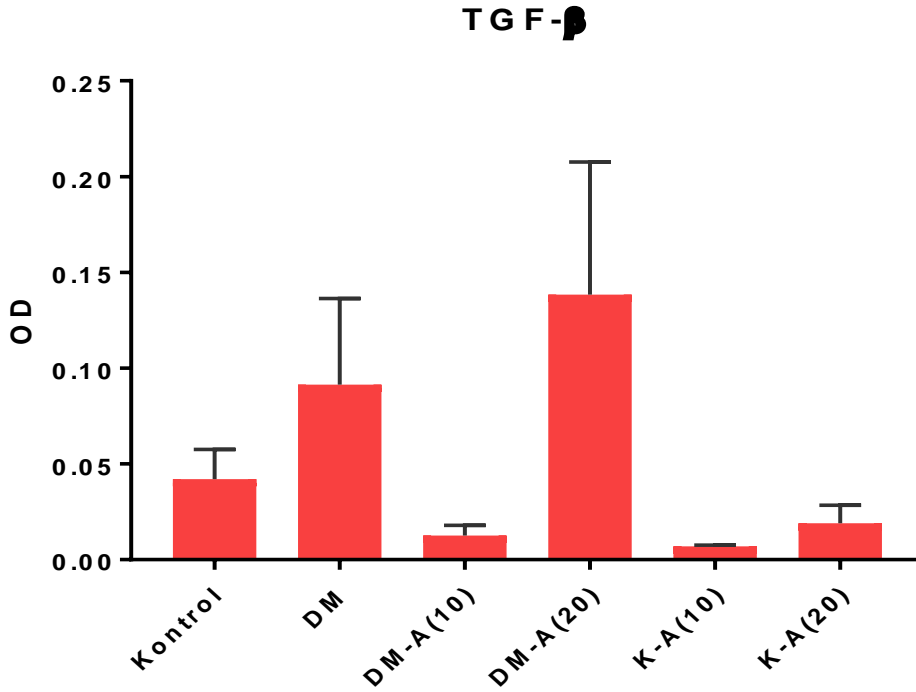


Çizim 4.68. K-A (20) grubuna ait ovaryumda TGF- β ekspresyonu, 20X.

Çizelge 4.20. Ovaryum doku kesitlerindeki TGF- β optikal densitesi (OD) seviyelerinin karşılaştırılması

Gruplar	($\bar{X}\pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	0,04 \pm 0,03	0,162
DM	0,09 \pm 0,08	
DM-A(10)	0,01 \pm 0,00	
DM-A(20)	0,14 \pm 0,12	
K-A(10)	0,007 \pm 0,00	
K-A(20)	0,02 \pm 0,02	

Gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.



Çizim 4.69. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda ovaryum doku kesitlerindeki TGF- β (optikal densitesi) OD seviyelerinin karşılaştırılması.

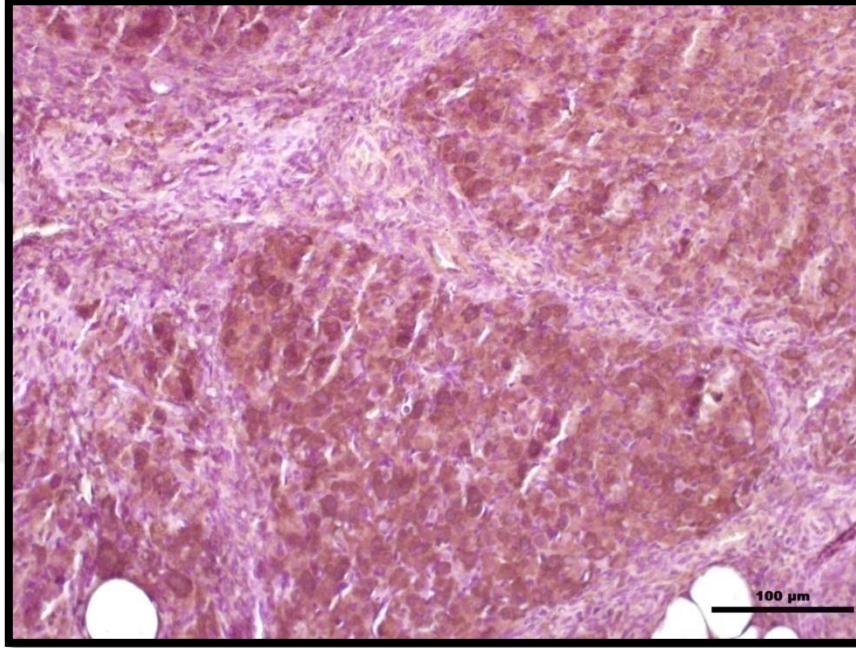
Gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Gruplardaki değerler ortalama (\bar{X}) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

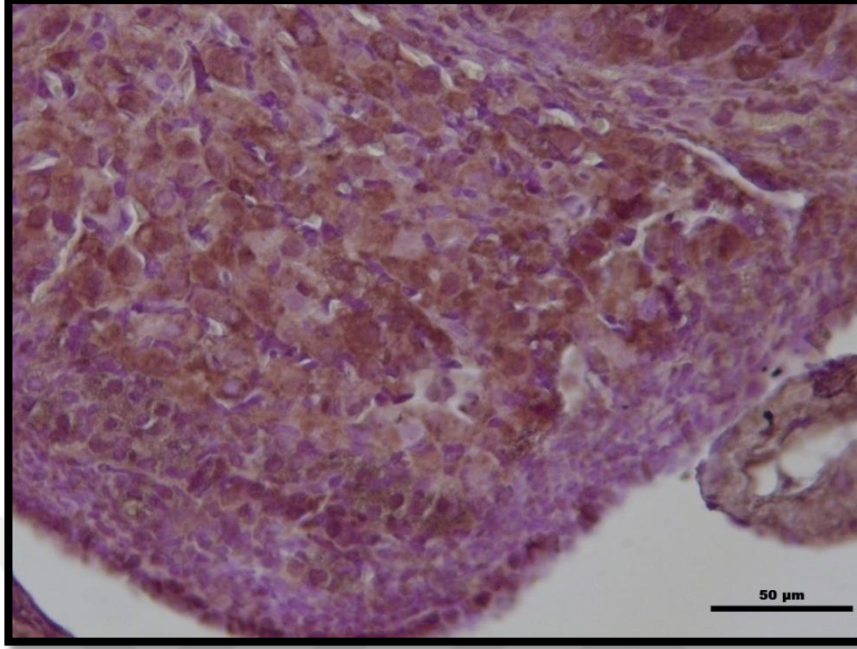
4.5.2.2. VEGF İşaretlemeesi

VEGF immunreaktivitesi, korpus luteum ve oositlerde gözlemlendi. Ovaryum doku kesitlerinde VEGF ekspresyonunun kuantifikasyonunda, kontrol grubuna göre diğer gruplarda daha az ekspresyon belirlendi. K-A(10) grubunda ekspresyonu biraz daha yüksek, diyabet gruplarında kontrole göre VEGF ekspresyonu düşüktü (Çizim 4.82).

Kontrol grubuna ait mikrograflar

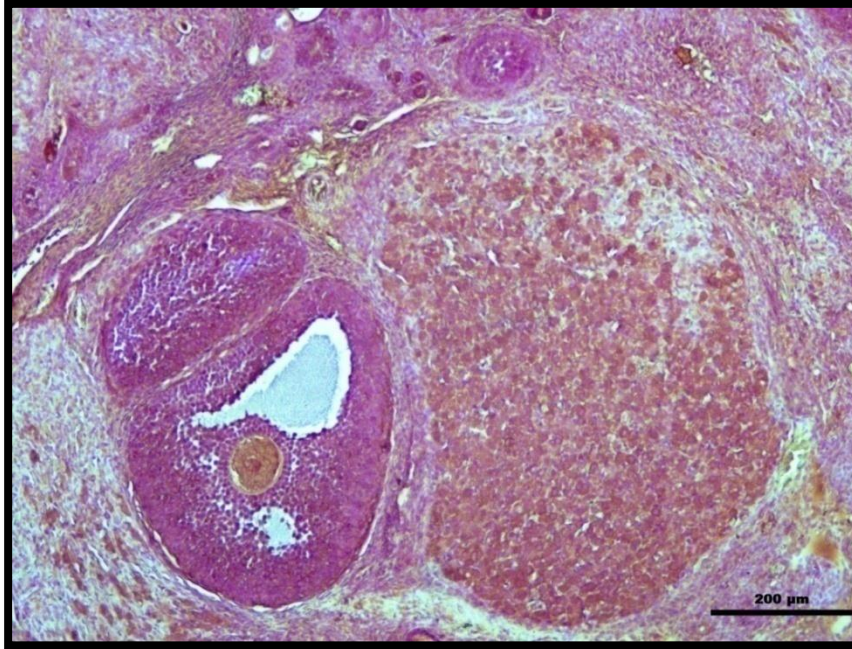


Çizim 4.70. Kontrol grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.

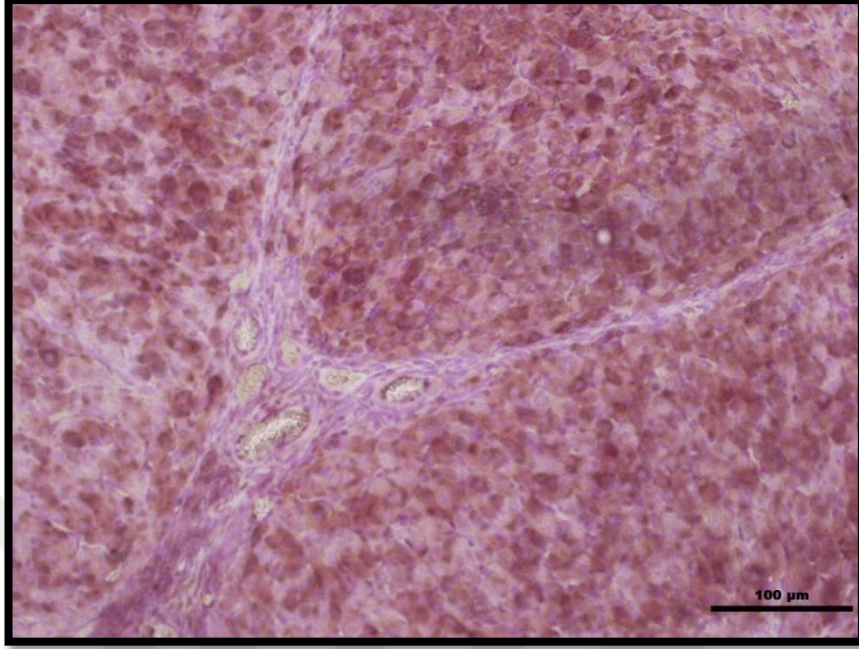


Çizim 4.71. Kontrol grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 40X.

DM grubuna ait mikrograflar

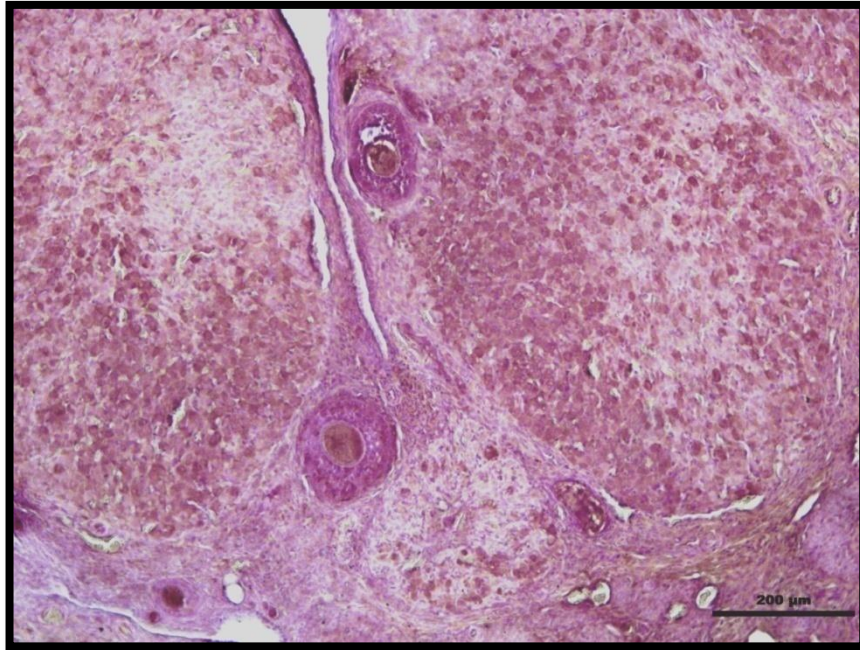


Çizim 4.72. DM grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.

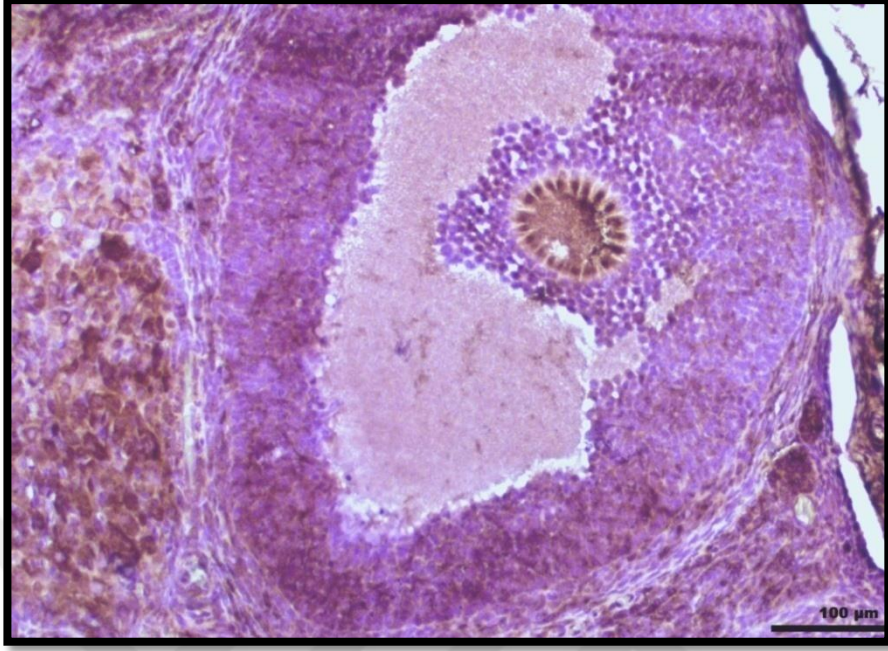


Çizim 4.73. DM grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.

DM-A(10) grubuna ait mikrograflar



Çizim 4.74. DM-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.

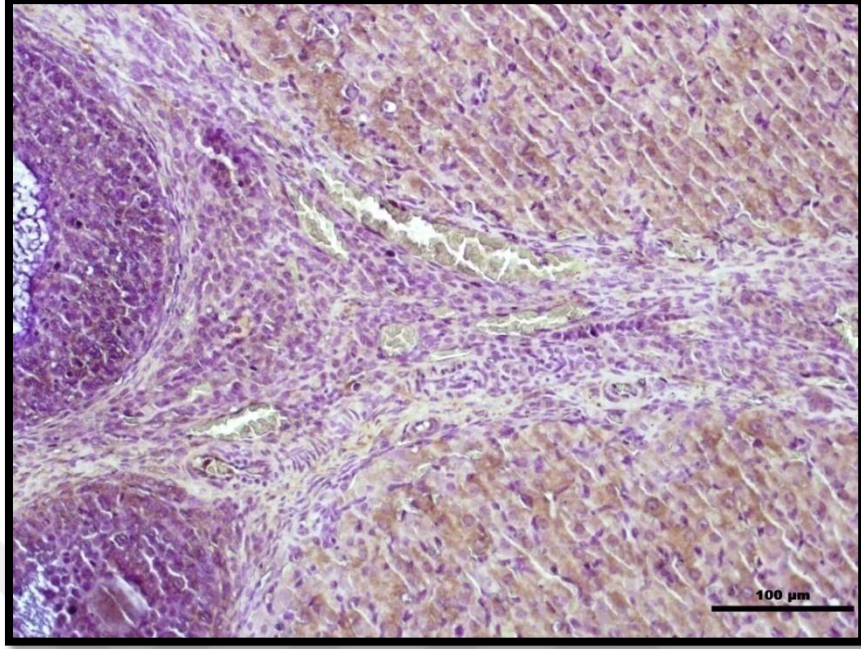


Çizim 4.75. DM-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.

DM-A(20) grubuna ait mikrograflar:

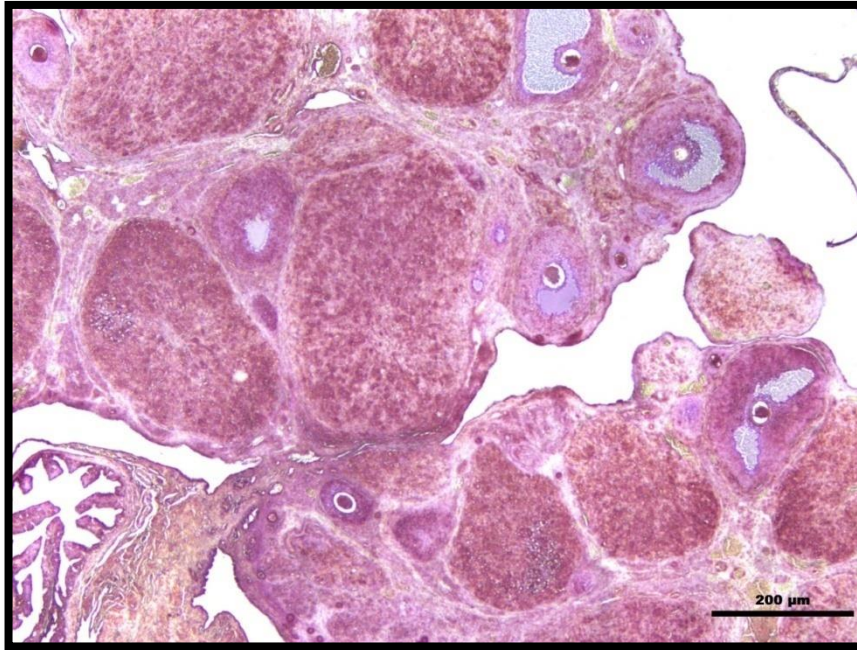


Çizim 4.76. DM-A(20) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.

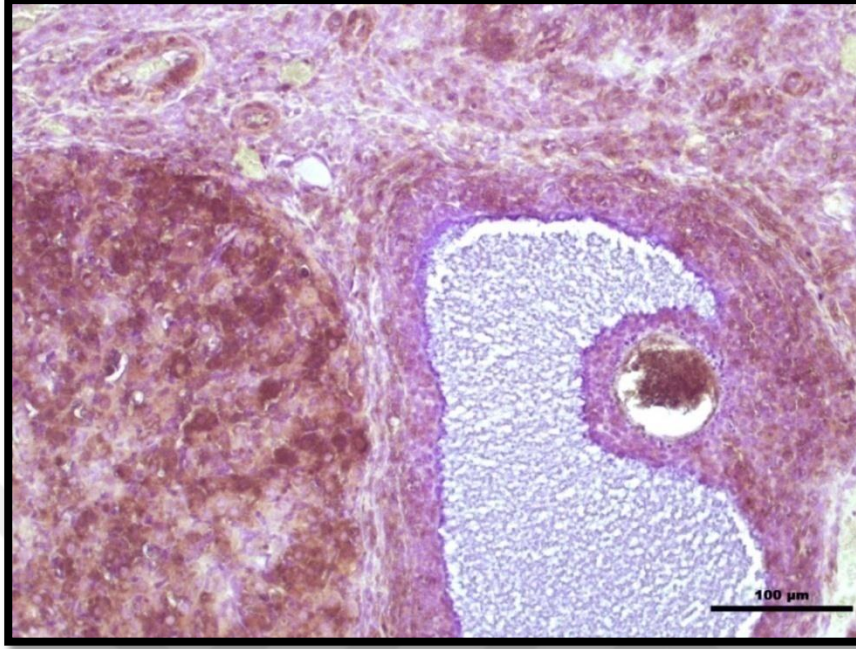


Çizim 4.77. DM-A(20) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.

K-A(10) grubuna ait mikrograflar

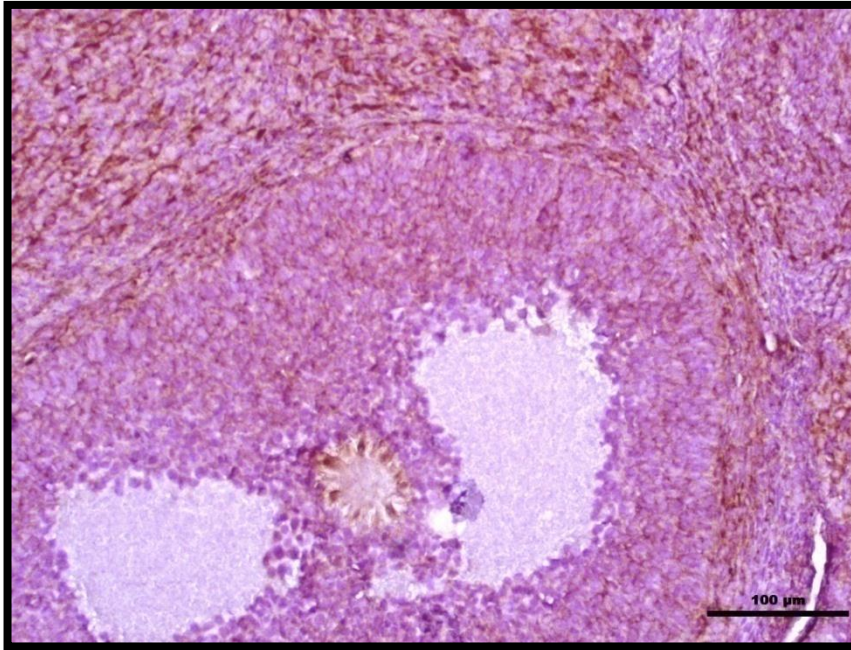


Çizim 4.78. K-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 10X.

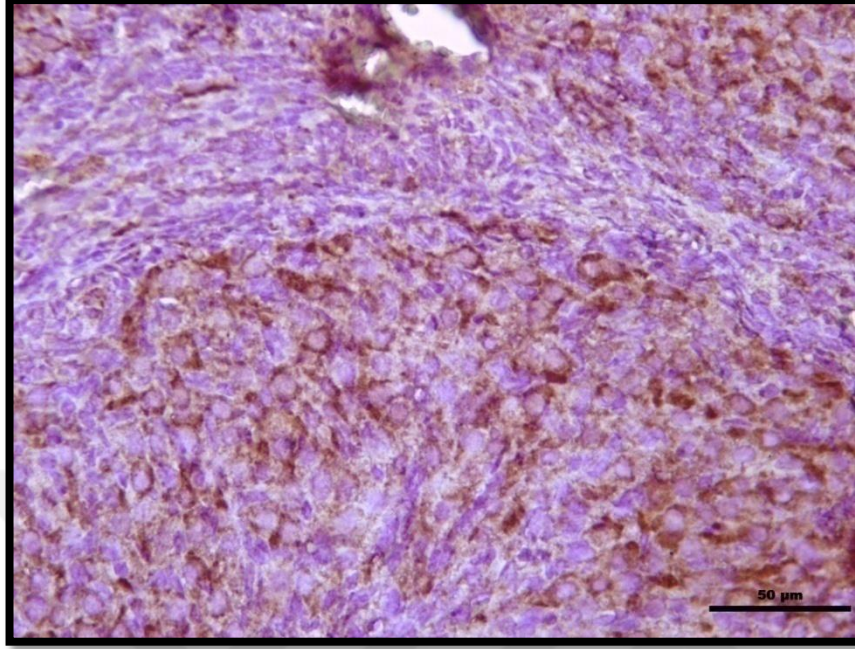


Çizim 4.79. K-A(10) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X

K-A(20) grubuna ait mikrograflar:



Çizim 4.80. K-A(20) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 20X.

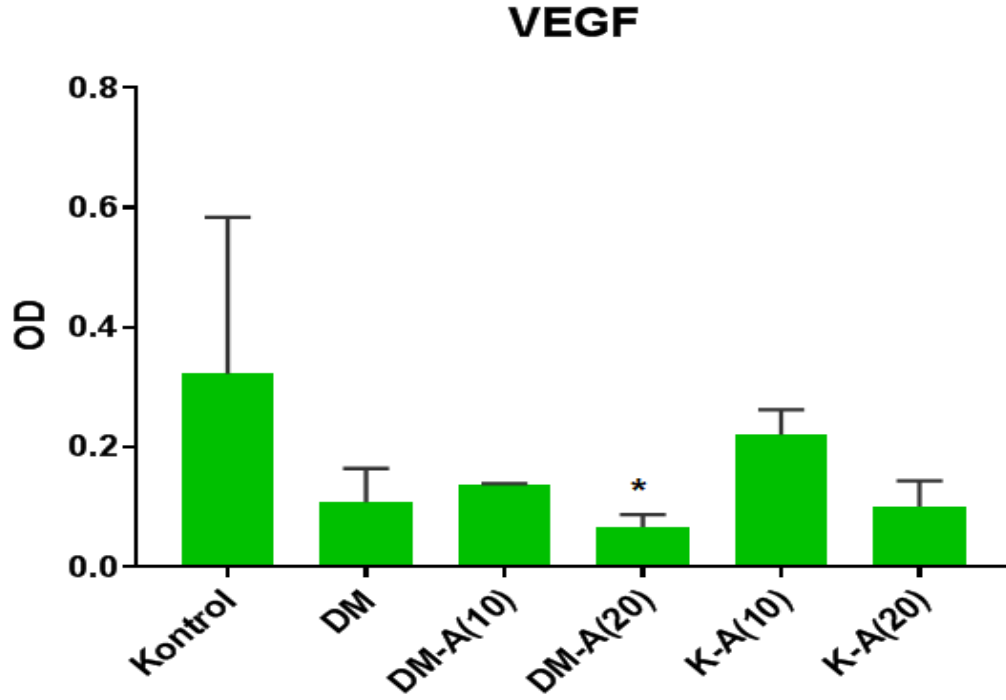


Çizim 4.81. K-A(20) grubu ovaryumda VEGF ekspresyonu, 40X.

Çizelge 4.21. Ovaryum doku kesitlerinde VEGF optik densitesi (OD) seviyelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	($\bar{X} \pm SD$)	Sig.=P
KONTROL	0,32±0,26	<0,05*
DM	0,11±0,06	
DM-A(10)	0,14± 0,00	
DM-A(20)	0,07±0,02	
K-A(10)	0,22±0,04	
K-A(20)	0,10±0,04	

* P<0.05 DM-A(20), Kontrol ve K-A(10) grupları ile kıyaslandığında arasında fark bulundu.



Çizim 4.82. Deney hayvanlarının, farklı gruplarda ovaryum doku kesitlerinde VEGF optik densitesi (OD) seviyelerinin karşılaştırılması.

P<0.05 * Kontrol ve K-A(10) grupları ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

4.5.2.3. TUNEL İşaretleme ile Apoptotik Hücre Tayini

Mikroskop altında incelendiğinde, bir kesitin üzerindeki bütün TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler sayıldı ve gruplara göre değerlendirildi. Apoptotik hücreler genellikle stromada gözlemlendi. Granuloza ve teka hücrelerinde, kontrol grubu dışında apoptotik hücre gözlemlenmedi. Stromadaki hücrelerde hafif ya da daha güçlü bir boyanma izlendi. Kontrol grubunda daha az ve hafif boyanmaya sahip apoptotik hücreler ortaya çıktı ve çok nadir granulozada da apoptotik hücre rastlandı (Çizim 4.83).

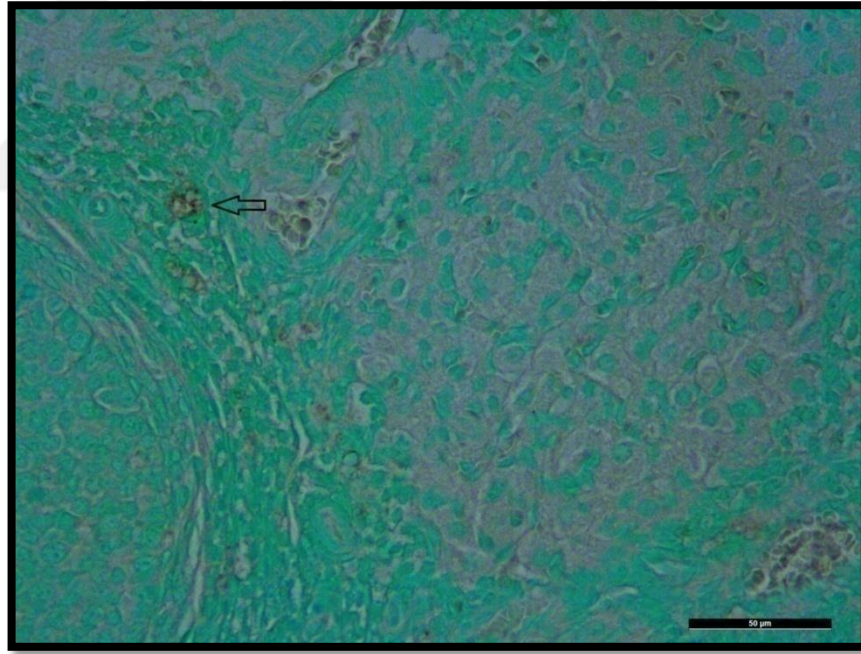
DM grubunda, daha fazla ve hem hafif hem güçlü boyanmış apoptotik hücreler gözlemlendi (Çizim 4.84).

DM-A(10) grubunda, kontrole göre apoptotik hücreler daha azdı ama daha koyu kahverengi boyanma gözlemlendi (Çizim 4.85).

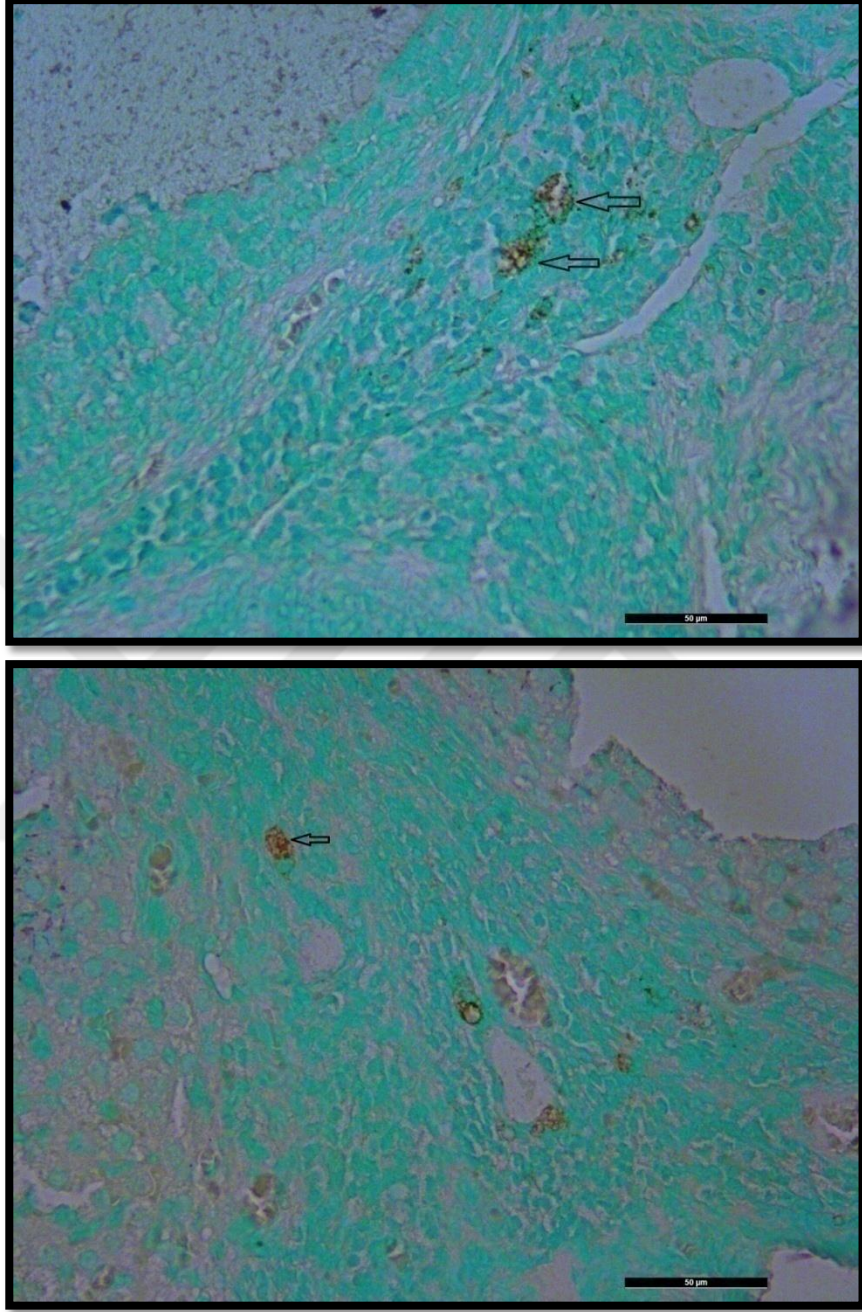
DM-A(20) grubunda daha fazla ve hem hafif, hem güçlü boyanmış apoptotik hücreler gözlemlendi (Çizim 4.86).

K-A(10) ve K-A(20) gruplarda, kontrol grubuna benzer olarak apoptotik hücelere daha nadir rastlandı. K-A(20) grubunda ise apoptotik hücrelerin boyanması güçlü idi (Çizim 4.87 ve Çizim 4.88).

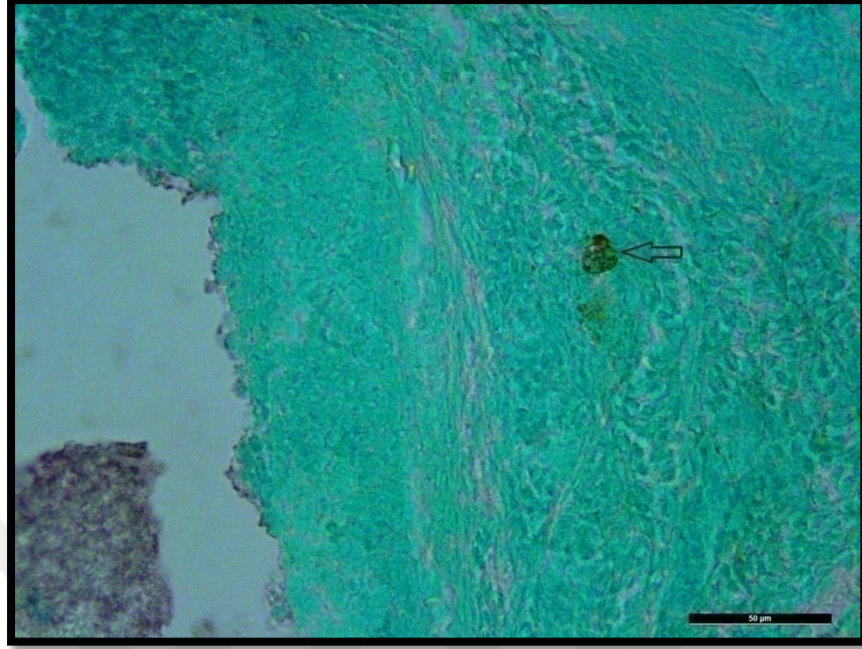
DM grubu ovaryum kesitlerinde, apoptotik hücre sayıları DM-A(10, DM-A(20) ve K-A(10) gruplarından anlamlı olarak ($P<0.05$) yüksek bulundu. Keza DM-A(10) grubunda ise apoptotik hücre sayısı K-A(10) grubuna göre $P<0.005$ düzeyinde düşük bulundu (Çizim 4.89).



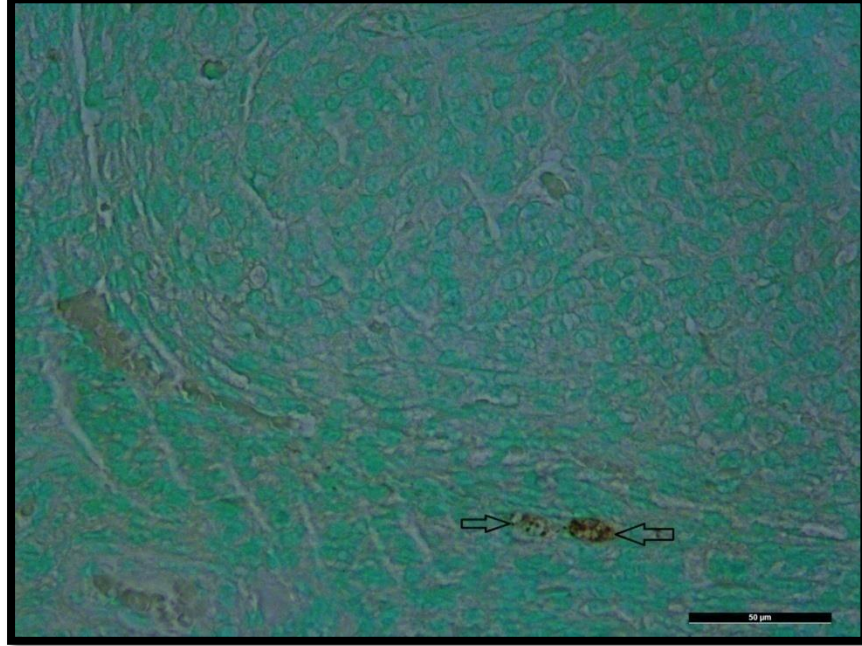
Çizim 4.83. Kontrol grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf. Kontrol grubuna ait ovaryum stromasında TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 40X.



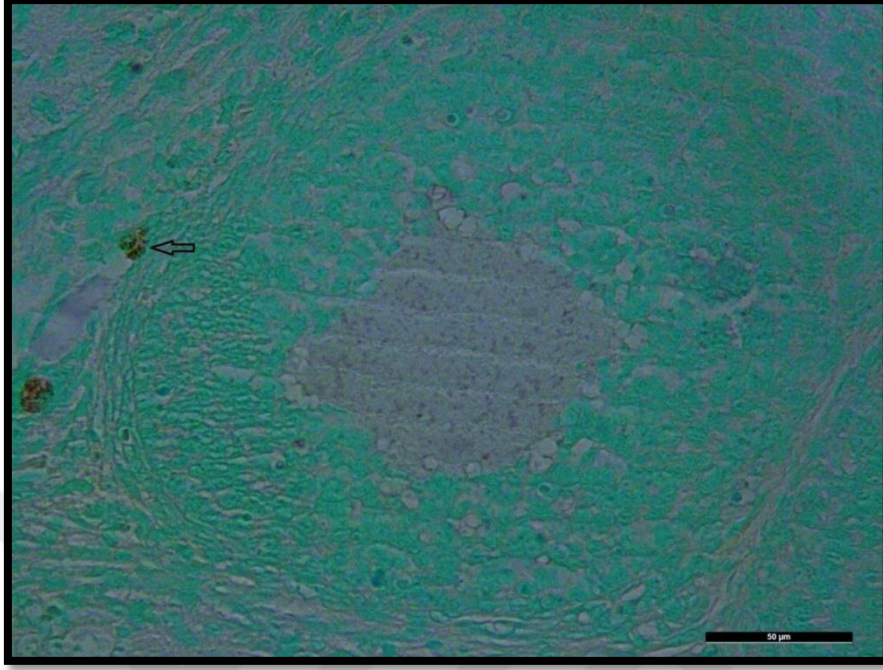
Çizim 4.84. DM grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograflar. DM grubu ovaryum stromasında TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 40X.



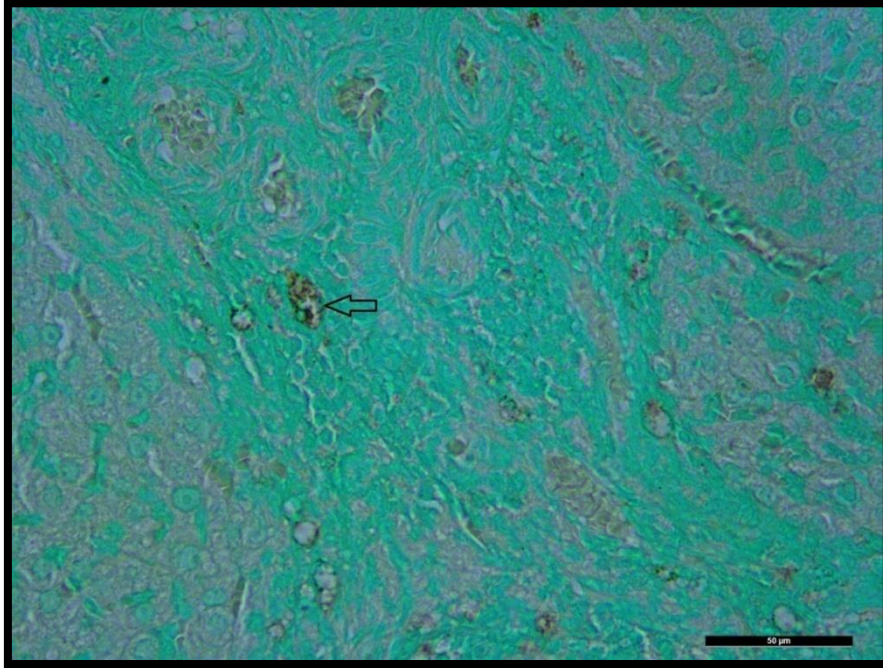
Çizim 4.85. DM-A(10) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf. DM-A(10) grubu ovaryum stromasında TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 40X.



Çizim 4.86. DM-A(20) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf. DM-A(20) grubu ovaryum stromasında TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 40X.



Çizim 4.87. K-A(10) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf. K-A(10) grubu ovaryum stromasında TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 40X.



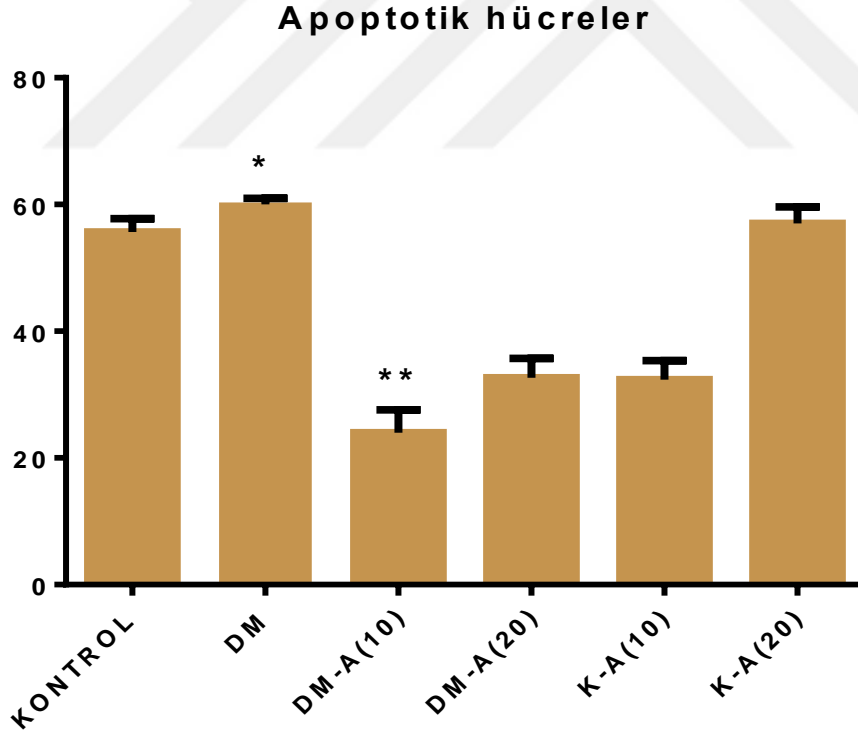
Çizim 4.88. K-A(20) grubuna ait TUNEL işaretlemesini gösteren mikrograf. K-A(20) grubu ovaryum stromasında TUNEL ile boyanmış kahverengi apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 40X

Çizelge 4.22. Ovaryum doku kesitlerdeki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması.

Gruplar	(X±SD)	Sig.=P
KONTROL	55,67±2,08	<0,05 ^{*+}
DM	60,33±1,05	
DM-A(10)	24,00±3,06	
DM-A(20)	32,67±3,05	
K-A(10)	32,33±3,05	
K-A(20)	57,00±2.64	

* P<0.05 DM grubu DM-A(10), DM-A(20) ve K-A(10) grupları ile kıyaslandığında.

+ P<0.005 DM-A(10), K-A(10) grubu ile kıyaslandığında istatistiksel fark var.



Çizim 4.89. Deney hayvanlarının farklı gruplarda ovaryum doku kesitlerindeki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması.

P<0.05 * DM-A(10), DM-A(20) ve K-A(10) grupları ile kıyaslandığında. P<0.005 ** K-A(10) grubu ile kıyaslandığında.

4.6. TEM ile Ultrastrüktürel İnceleme

Kontrol grubunun toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerinin incelemesinde düzenli morfolojide primer ve sekonder foliküller gözlenmiştir. Granuloza hücreleri arasında bol miktarda mitotik figürlere rastlanmıştır. Primer oosit yapısı düzenli morfolojide izlenmiştir. Granuloza hücreleri düzenli morfolojidedir, sitoplazmasında çok sayıda lipid vaküolleri izlendi (Çizim 4.90 A ve B).

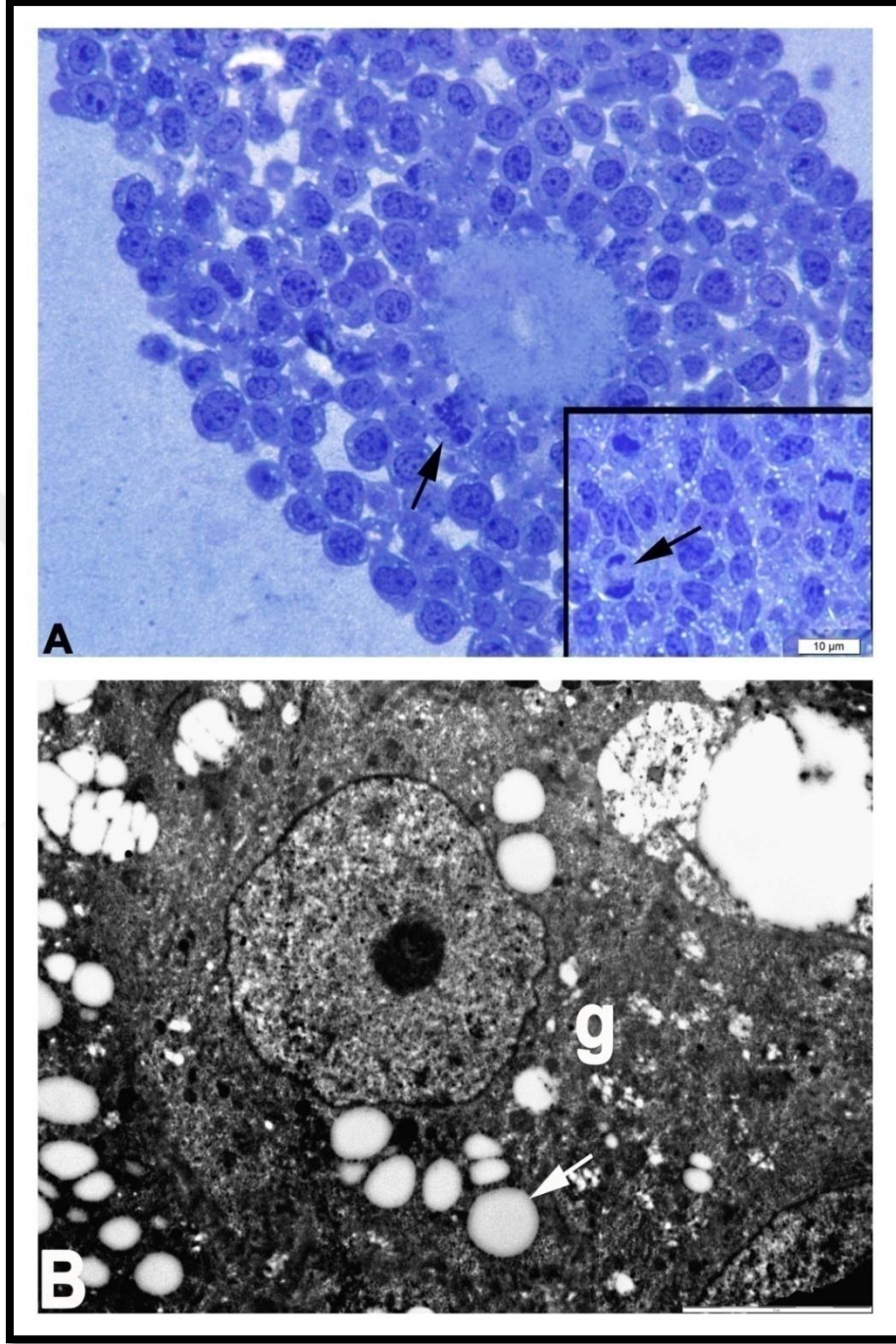
Diyabet (DM) grubunda toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerinin incelemesinde genel olarak düzenli morfolojide primer ve sekonder foliküller gözlenmiştir. Granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol lipid vaküollerinin varlığı yer yer de lipid içeriğinin bozularak lamellar tarzda birikimlerin olduğu gözlenmiştir (Çizim 4.91 A ve B).

DM-A(10) grubunun toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerinin incelemesinde düzenli morfolojide primordiyal foliküller gözlenmiştir, bununla birlikte bazı alanlarda atretik foliküllerin varlığı gözlenmiştir. Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlenmiştir (Çizim 4.92 A ve B).

DM-A(20) grubunun toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerinin incelemesinde çok sayıda düzenli morfolojide primordiyal foliküller gözlenmiştir. Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlenmiştir, bazı alanlarda az sayıda lipid vaküolleri lamellar tarzda bozulmuş morfolojide izlenmiştir. Granuloza hücrelerinin arasında mitotik figürlere rastlanmıştır (Çizim 4.93 A ve B).

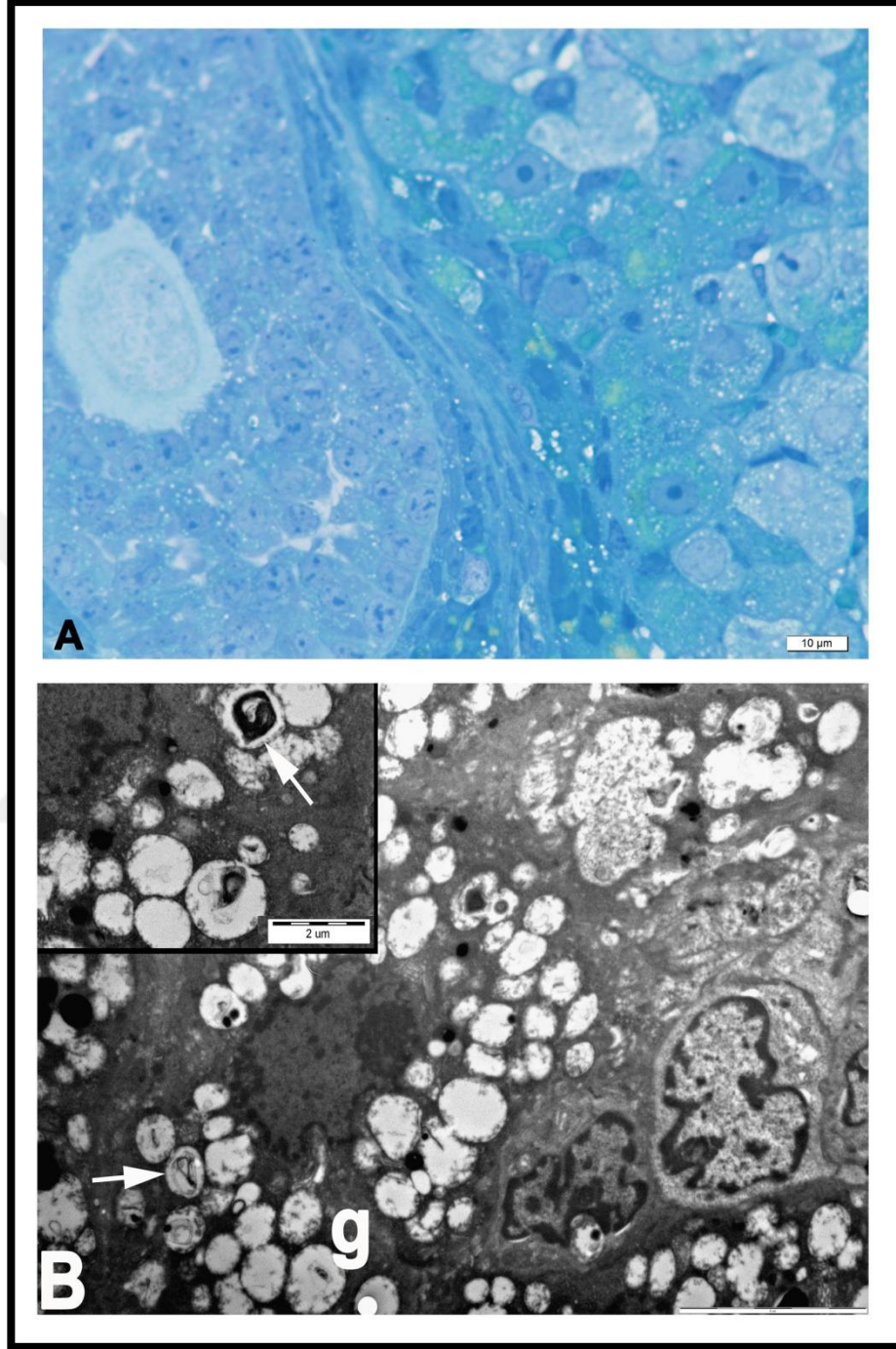
K-A(10) grubunun toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerinin incelemesinde düzenli morfolojide primer ve sekonder foliküller gözlenmiştir. Primer oosit yapısı düzenli morfolojide izlenmiştir. Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlendi (Çizim 4.94 A ve B).

K-A(20) grubunun toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerinin incelemesinde düzenli morfolojide primer ve sekonder foliküller gözlenmiştir. Granuloza hücreleri arasında bol miktarda mitotik figürlere rastlanmıştır. Primer oosit yapısı düzenli morfolojide izlenmiştir. Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlenmiştir (Çizim 4.95 A ve B).

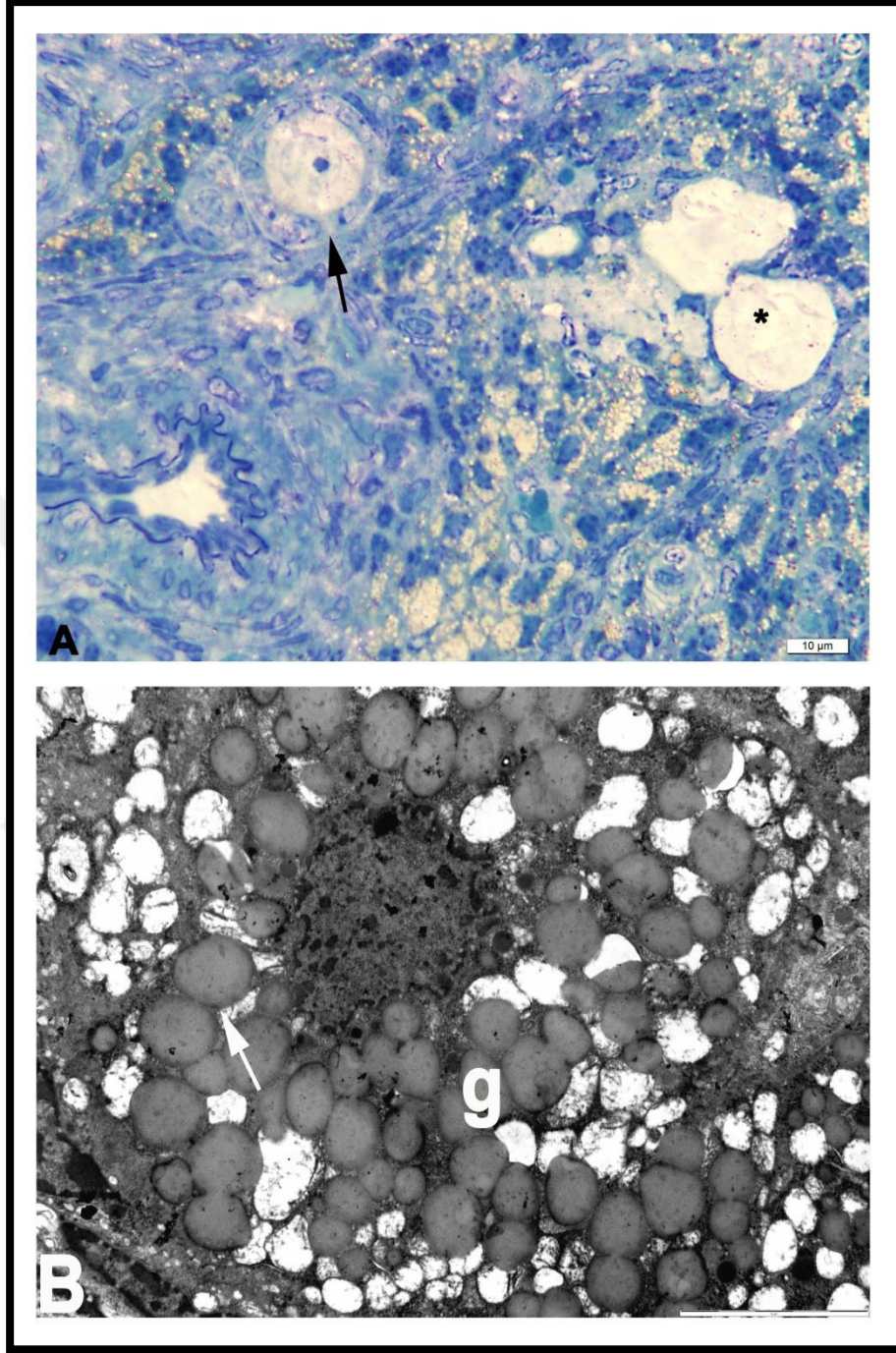


Çizim 4.90. Kontrol grubuna ait elektron mikrograf:

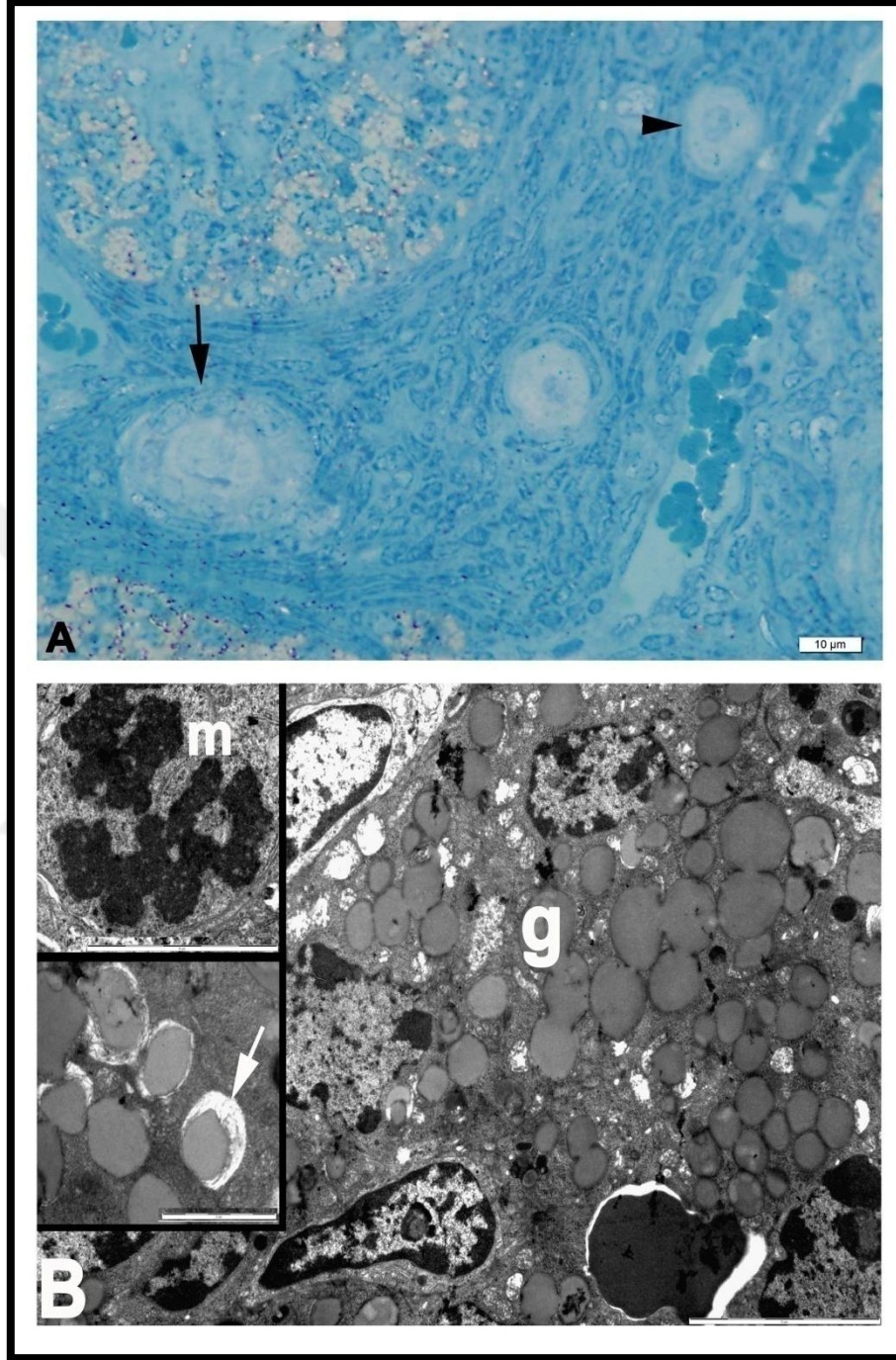
(A) Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitte düzenli morfolojide sekonder folikül gözlenmektedir. Primer oosit yapısı düzenli morfolojide izlenmektedir. Granuloza hücreleri arasında bol miktarda mitotik figürler (ok) görülmektedir. (B) Granuloza hücrelerinin (g) sitoplazmasında çok sayıda lipid vaküolleri ile düzenli morfolojide izlenmiştir.



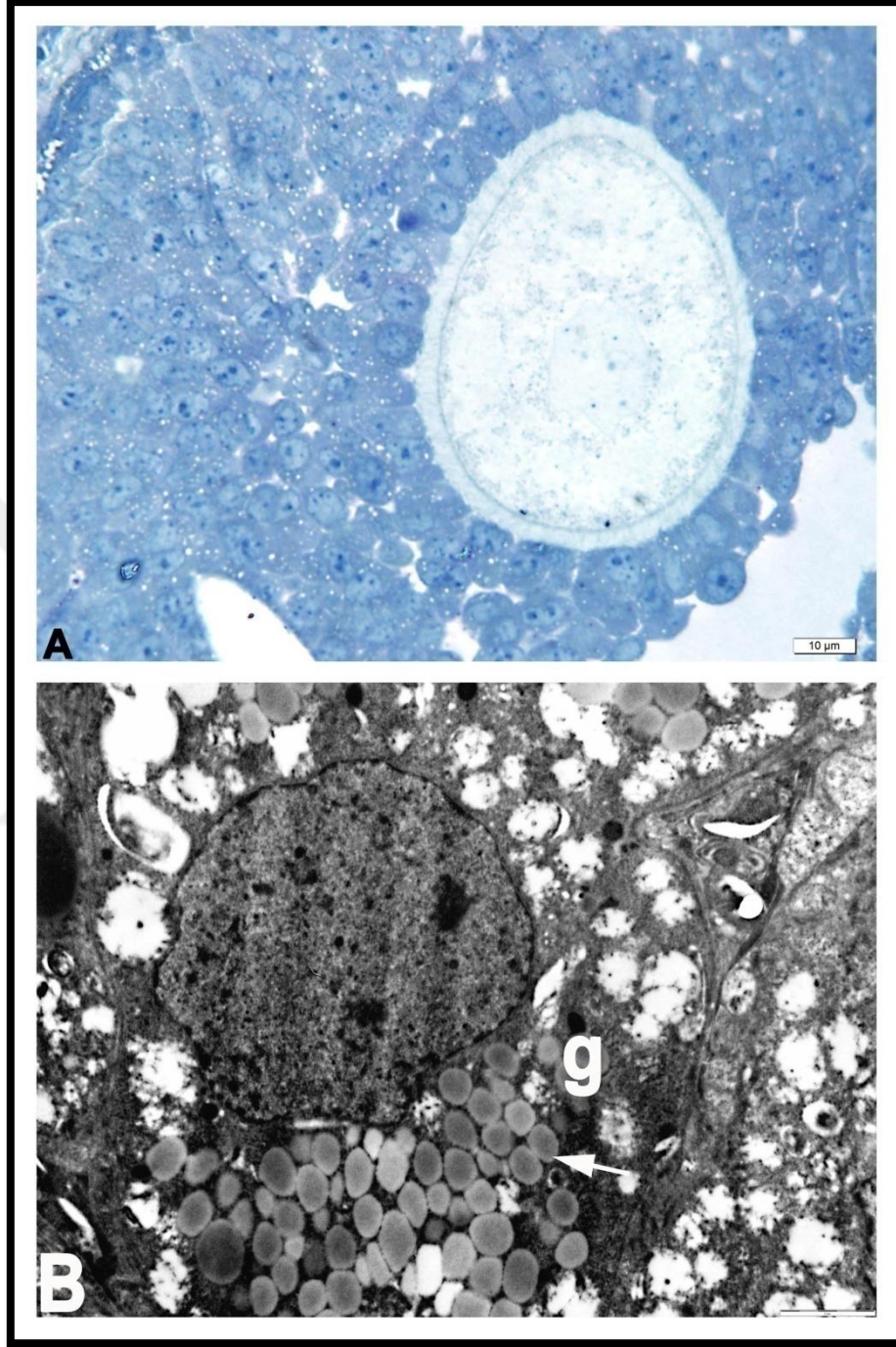
Çizim 4.91. DM grubuna ait elektron mikrograf: (A) Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitte genel olarak düzenli morfolojide sekonder folikül gözlenmektedir. (B) Granuloza hücrelerinin (g) sitoplazmasında bol lipid vaküollerinin varlığı yer yer de lipid içeriğinin bozularak lamellar (ok) tarzda birikimlerin olduğu gözlenmektedir.



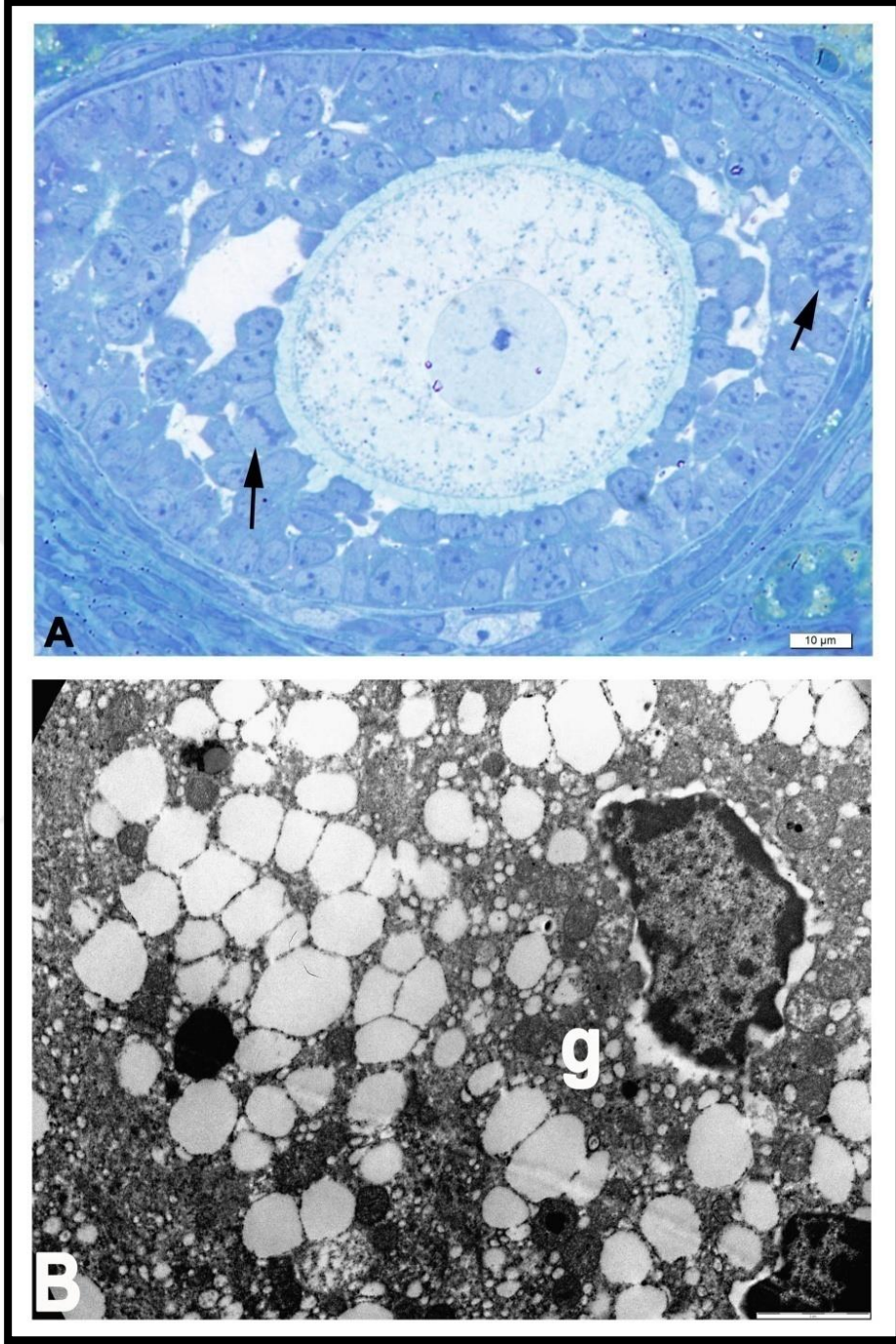
Çizim 4.92. DM-A(10) grubuna ait elektron mikrograf: (A) Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitte düzenli morfolojide primordiyal folikül (ok) ve atretik folikül (*) görülmektedir. (B) Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlenmektedir.



Çizim 4.93. DM-A(20) grubuna ait elektron mikrograf: (A) Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitte düzenli morfolojide primordiyal folikül (ok başı) ve primer folikül (ok) gözlenmektedir. (B) Düzenli morfolojideki granuloza hücresinin (g) sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlenmektedir. Bazı lipid vaküolleri lamellar tarzda (ok) bozulmuş morfolojide izlenmektedir. Granuloza hücrelerinin arasında mitotik figürler (m) rastlanmıştır.



Çizim 4.94. K-A(10) grubuna ait elektron mikrograf: (A) Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitte düzenli morfolojide primer oosit ile birlikte sekonder folikül gözlenmektedir. (B) Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin (g) sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküollari (ok) izlenmektedir.



Çizim 4.95. K-A(20) grubuna aitelektron mikrograf: (A) Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitte düzenli morfolojide primer oosit ile birlikte sekonder folikül gözlenmektedir. Granuloza hücreleri arasında bol miktarda mitotik figürler (ok) görülmektedir. (B) Düzenli morfolojideki granuloza hücrelerinin (g) sitoplazmasında bol miktarda lipid vaküolleri izlenmektedir.

4.7. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

AMH ve TGF- β gen ekspresyon analizi RT-PCR tekniğiyle yapıldı. AMH ve TGF- β gen ekspresyon düzeyi en yüksek DM-A(10) grubunda bulundu.

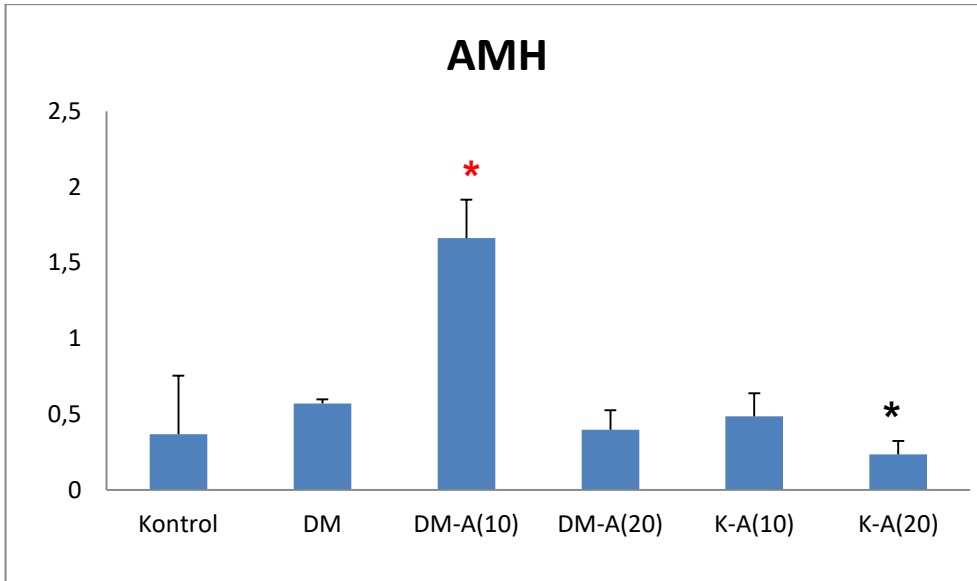
4.7.1. Ovaryum Dokusu AMH Gen Ekspresyonu

Kontrol grubumuzla karşılaştırıldığında DM-A (10) grubunun AMH gen ekspresyonlarında diğer gruplara göre anlamlı derecede artış saptandı (Çizelge 4.23 ve Çizim 4.96).

Çizelge 4.23. Ovaryum dokusu AMH gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Gruplar	(X \pm SD)	Sig.=P
KONTROL	0,37 \pm 0,39	<0,05*
DM	0,57 \pm 0,03	
DM-A(10)	1,66 \pm 0,25	
DM-A(20)	0,40 \pm 0,13	
K-A(10)	0,48 \pm 0,15	
K-A(20)	0,23 \pm 0,09	

*P<0,05 K-A(20), DM grubu ile kıyaslandığında; bütün grupları DM-A(10) grubu ile kıyaslandığında.



Çizim 4.96. Deney hayvanlarının farklı gruplarda doku AMH (Anti Mullerian Hormon) gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması. P<0,05 bütün grupları * DM-A(10) grubu ile kıyaslandığında; * DM grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

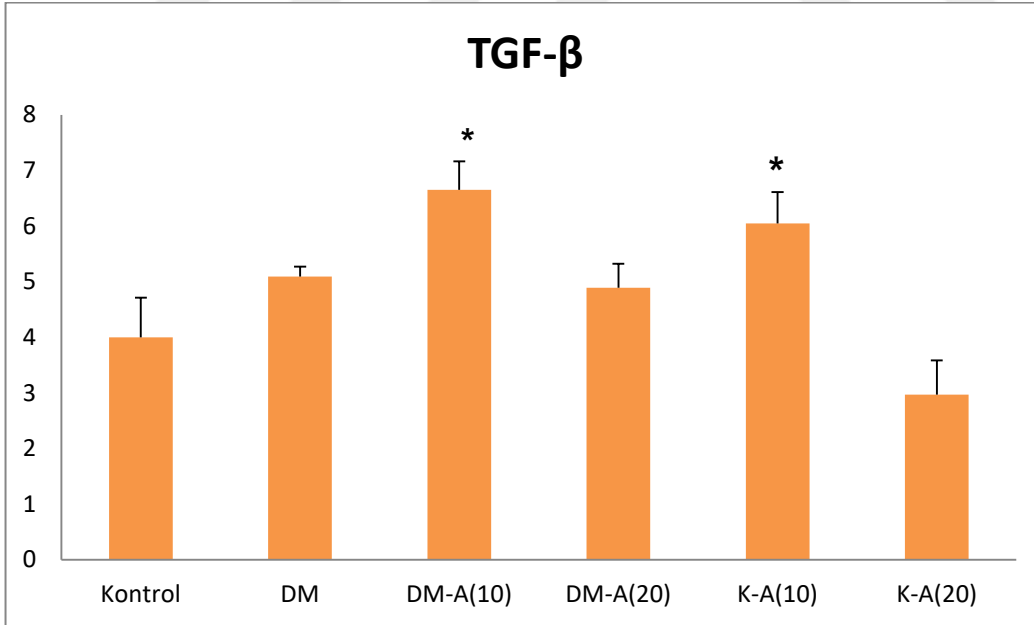
4.7.2. Ovaryum Dokusu TGF- β Gen Ekspresyonu

TGF- β gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında DM-A (10) ve K (10) gruplarında kontrol grubu ve diğer gruplara göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir (Çizelge 4.24 ve Çizim 4.97).

Çizelge 4.24. Ovaryum dokusu TGF- β gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Gruplar	(X \pm SD)	Sig.=P
KONTROL	4,00 \pm 0,70	<0,05 ^{*+}
DM	5,09 \pm 0,18	
DM-A(10)	6,65 \pm 0,51	
DM-A(20)	4,90 \pm 0,43	
K-A(10)	6,05 \pm 0,56	
K-A(20)	2,97 \pm 0,62	

*P<0,05 DM-A(10) ve K-A(10), K-A(20) grubu ile kıyaslandığında;



Çizim 4.97. Deney hayvanlarının farklı gruplarda ovaryum dokusu TGF- β gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.

P<0,05 * K-A(20) grubu ile kıyaslandığında.

Gruplardaki değerler ortalama (X) \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi.

5.TARTIŞMA

Diyabetes mellitus (DM), insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki defektler nedeniyle vücudun karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik bir metabolizma hastalığı olarak tanımlanmaktadır (D'Souza ve diğ. 2009). Günümüzde dünyada DM prevalansı 370 milyon vakanın üstünde kabul edilmektedir (IDF Diabetes Atlas Group 2015). 1970'li yıllardan bu yana kullanılan statinler günümüzde en çok reçete edilen ilaç grubudur (Whayne 2011).

Statinler, kardiyovasküler hastalıkların onlenmesi ve hiperkolesteroleminin kontrolü için önemli role sahiptirler (Fulcher ve diğ. 2015, Baigent ve diğ. 2010).

Çalışmamızda, STZ ile diyabet modeli oluşturduğumuz sıçanlarda vücut ağırlığı ile kanda ve ovaryum dokusunda diyabetin ve Atorvastatin'in glikoz homeostazisi, oksidativ stres parametreleri ve lipid profili üzerine etkisini üç haftalık bir deney süre içinde araştırdık. DM grubu sıçanlarda kan glikoz seviyeleri deneyin sonuna kadar yüksek bulundu ve glikoz seviyeleri 300 mg/dL altına düşmedi. Zamana bağlı kan glikoz düzeylerinin ölçümlerini değerlendirdiğimizde 28. gün ölçümlerinin 48. saate göre anlamlı şekilde düşük olduğunu gözlemledik. Atorvastatin almayan DM grubunda da gözlemlediğimiz bu anlamlı düşüklüğün nedeninin STZ ile oluşturduğumuz DM modeli hayvanlarda 28 güne kadar beta hücrelerinde oluşan iyileşmeden kaynaklandığını düşünmekeyiz. Yani STZ uygulanan her üç grupta düşme meydana geldiği için, bu azalmaya Atorvastatin'in sebep olduğunu ve Atorvastatin'in antidiyabetojenik etkiye sahip olduğunu söyleyemeyiz.

Tam tersine, taranabilen literatürde araştırmaların çoğuna dayanarak, Atorvastatinin kan ve ovaryum üzerinde antioksidan ve antienflamatuar etkisin yanında, diyabetojenik etkiye sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Son yıllarda uzun süreli düzenli statin kullanan hastalarda DM insidansının arttığına dair yayınlar bulunmaktadır (Yoon ve diğ. 2016). Klinik sonuçlara yönelik çalışmalar statin sonrası DM riskinde % 20-30 artış göstermektedir (Kei ve diğ. 2015).

Bazı çalışmalarda statinlerin yeni diyabet gelişimi üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamıştır (Freeman ve diğ. 2001).

Diğer bazı araştırmalar risk artışı göstermişlerdir. Sattar ve arkadaşları, prestijli Lancet dergide yayınlan kendi meta analizinde, statin alan kişiler, plasebo veya standart bakım

alanlara kıyasla biraz daha fazla diyabet riski altında olduğunu göstermişler (Satter ve diğ. 2010).

Statin kullanımı, tip 2 diyabetin artmış bir insidansına bağlanmıştır (Preiss ve diğ. 2011), ve WHI'nin bir analizi (Women's Health Initiative) statin alan postmenopozal kadınlarda DM riskinin arttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, statin tedavisinin diyabet riskini bir moleküler mekanizma yoluyla artırdığını kanıtlamaz, ancak bu olasılığın göz önünde bulundurulmasına ve statin tedavisinin diyabetin gelişimine yol açan mekanizmaları tetikleyebileceği varsayımına yol açmıştır (Culver ve diğ. 2012).

Bizim çalışmamızda, 10 ve 20 mg/kg/gün Atorvastatin verdiğimiz hayvanların kontrol grupları, glikozun her zaman 300'ün üzerinde olduğu STZ uygulanan Diyabetik grupların aksine, tedavi süresince kan glikoz seviyelerinde artış olmamıştır. İnsanda yapılan uzun süreli çalışmaların aksine, bizim çalışmamızda, diyabetik olmayan gruplarda Atorvastatin'in diyabetojenik etkisini kanıtlayamadık ve zaman faktörünün çok önemli olduğunu vurgulamak gerekir, çünkü üç haftalık bir deny periyodu bu sonuç için yeterli olmayabilir. Bizim çalışmamızda, insulin ve glikoz sonuçlarına göre insulinin yükselmesine rağmen, glikozun düşmediğinin gözlenmesi bunun bir insulin direnci olduğunu düşündürmektedir ve HOMA-IR formülü kullandıktan sonra elde ettiğimiz sonuçlara göre, Atorvastatin alan diyabetik gruplar insülin direnci gösterdiler.

Hayvanlar ve insanlardaki insülin direnci üzerine statinlerin kısa süreli etkilerini araştıran bazı çalışmalarda olumlu etki tespit edilmiştir (Lalli ve diğ. 2008, Takagi ve diğ.2008), diğer araştırmacılar olumlu etki tespit etmemişlerdir (Gannage-Yared ve diğ.2005, Naples ve diğ. 2008, Szendroedi ve diğ. 2009).

Başka bir çalışmada Mallinson ve arkadaşları (2015) statinlerin en ciddi yan etkisinin iskelet kasında miyopati ve rabdomiyolizi, insulin direncinin sonucu olduğunu bildirmişlerdir (Mallinson ve diğ. 2015). Başka bir hayvan çalışmada Atorvastatin'in, insulin direncini düşürdüğü, direkt pankreasa toksik etki göstererek apotpoz yolaklarını aktifleştirerek diyabet riskini yükselttiğini bildirilmişlerdir (Sadighara ve diğ. 2017).

Bazı in vitro çalışmalarda, statin kullanımının pankreastaki beta hücresi işlevi ve düz kas insülin direnci için zararlı olabileceği ileri sürülmüştür (Zhao and Zhao 2015).

Bizim çalışmamızda Atorvastatin'in sağlıklı nondiyabetik sıçanlarda, insülin seviyelerini ve insülin duyarlılığını etkilemediği fakat diyabetli Atorvastatin ile tedavi edilen gruplarda insülin ve HOMA-IR düzeylerini arttığı gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda DM grubundaki sıçanların ağırlıkları deneyin sonuna kadar düşmeye devam etmiştir. Atorvastatin alan diyabet gruplarında kilo kaybının tedavi sayesinde durduğu gözlemlendi. 21 gün boyunca 10mg/kg/gün Atorvastatin ile tedavi edilen sağlıklı gruplarda, vücut ağırlıklarının artışı durdu ve 20mg/kg/gün Atorvastatin dozu K-A(20) grubunda vücut ağırlığında hafif bir düşmeye neden oldu. Bu bize 20 mg/kg/gün Atorvastatin dozunun toksik etkisiye sahip olduğunu düşündürmüştür ; bu toksik etki, diyabetik olmayan sağlıklı gruplarda gözlemlendi, diyabetik gruplarda ise Atorvastatin olumlu bir etki gösterdi.

Çalışmamızda Atorvastatinin hayvanların yaşamlarını devam ettirmelerine önemli bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Atorvastatin tedavi grubunda hayvan kaybı olmadığı ve genel durumlarının iyileştiği gözlemlendi. Diyabetik ve Atorvastatin alan gruplarında vücut ağırlıkları daha yüksek bulundu, bu da büyük bir hayatta kalma oranıyla sonuçlandı, ancak aynı zamanda bu gruplar daha yüksek plazma insülini ve glukoz konsantrasyonları ve daha düşük insülin duyarlılığı gösterdi.

Ayrıca, araştırmacılar, statin tedavisi alan hastalardaki diyabet riskinin çok küçük olduğunun altını çizerek statinlerin kardiyovasküler ölüm, kalp krizi ve inme gibi hastalıkları azaltıcı etkilerinin, diyabet riskine kıyasla çok daha ağır bastığını vurgulamışlardır. Statinlerin yararlarının olası zararlarından kat kat fazla olması nedeniyle statin kullanan hastaların tedavilerine devam etmelerini önermektedirler (Sattar ve diğ. 2010).

Bizim çalışmamızda, Atorvastatin ile tedavi edilen diyabetik gruplarda trigliseritlerde ciddi bir azalma olduğu, özellikle diyabetik grupta kullanılan 20 mg/kg/g dozu, trigliserit miktarını 10 mg/kg/g dozundan daha fazla düşürmüştür. Çalışmamızda, trigliserid seviyesinin düşürme açısından K-A(10) grubunda K-A(20)'ye göre daha etkili olduğunu gözlemlendi. Bunun aksine 20 mg/kg/g paradoksal bir şekilde trigliseritlerin şiddetli bir azalmaya yol açmamıştır. Bu bize daha fazla araştırma gerektiren bu dozun başka bir potansiyel toksik etkiyi düşünmemizi sağlamaktadır.

HDL kolesterol seviyeleri diyabet grubuna azaldı ve farklı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu fakat Atorvastatin'in kullanıldığı gruplarda bir artış gözlemlendi.

Dislipidemi ve IR arasında ilişki nedeniyle, oranı değerlendirmek için kullanılan indekslerden biri TG/HDL-C için aterojenik indeksdir. TG/HDL-C oranı IR e pratik marker olarak önerilmiştir (McLaughlin ve diğ. 2003). Bazı çalışmalar bu aterojenik indeksin kardiovasküler hastalık ve ilk kardiovasküler olayın bir göstergesi olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak, Sumner ve arkadaşlarının bildirdiği gibi, TG/HDL oranının, Afro-Amerikan insanlarda, IR'nin iyi bir marker olmadığını göstermişler (Summer 2005). Bizim sonuçlarımıza göre Diyabetli Atorvastatin alan gruplarında bu parametreler arasında bir korelasyon görmedik ve bu gruplarda TG/HDL oranının IR'nin iyi bir göstergesi olmadığını söyleyebiliriz. Bu kanıtlayamadığımız korelasyon, çalışmamızdaki örnek sayısı ve/veya deney süresinin uzun olmaması nedeniyle olabilir.

Diyabet hastalığının seyri esnasında serbest radikal düzeyinin artmasına bağlı olarak vücudun antioksidan savunma kapasitesinin azalması ile birlikte oksidatif stresin zararlı etkilerinde artış ortaya çıkmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda da diyabetik sıçanlarda antioksidan savunma sisteminin değiştiği ve kronik hipergliseminin serbest radikal düzeyinin artmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (Kaneto ve diğ. 2004, Robertson ve diğ. 2004).

Brownlee ve arkadaşları, (2001) yüksek glikoz koşulları altında, mitokondri tarafından fazla üretilen ROT'nin, oksidatif strese yol açtığını göstererek bu alandaki araştırmaya öncülük etmişlerdi (Brownlee 2001). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda ROT'un ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Brownlee 2005). Sonuç olarak: DM karbonhidrat, yağ, protein metabolizması bozukluklarıyla ortaya çıkan kronik metabolik bir hastalık olmakla beraber aynı zamanda nonenzimatik glikozilasyon, sorbitol yol aktivitesi, heksozamin yolu aktivitesi, oksidatif glikozilasyon, protein kinaz C aktivitesi ve enerji metabolizmasındaki değişiklikler ile artmış bir oksidatif stres durumudur (Vincent ve diğ. 2004). Bizim çalışmamızda da aynı şekilde, kanda ve ovaryum doku homojenatında, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA oksidan olarak ölçüldü ve DM grubunda yüksek değerlerde bulundu. Bizim çalışmamızda, gruplar arası serum MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen, DM ve 20 mg/kg Atorvastatin alan kontrol grubu, MDA seviyelerinin en yüksek olduğu fark edildi. 20 mg/kg Atorvastatin alan sağlıklı grupta ilacın zararlı ve toksisitite ortaya çıkardığı fark edildi.

Diyabette serbest radikal oluşumunun artmasına karşılık radikal tutucu sistemlerde de azalma olduğu ileri sürülmektedir (Köseoğlu ve diğ. 1999).

Tip 1 diyabetik hastalarda antioksidan statü parametrelerini inceleyen çalışmalarda bulgular çelişki göstermektedir. Bazı çalışmalarda antioksidan düzeylerinin arttığı (Griesmacher ve diğ. 1995), diğerlerinde ise azaldığı bildirilmiştir (Giugliano ve Ceriello, 1996). Kaul ve arkadaşları (1996) diyabetik hastalarda antioksidan düzeyinde bir azalma bildirilmiştir ve STZ-indüklenmiş diyabetik sıçanlarda antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri kontrol grubuna göre % 50 daha düşük olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda antioksidan olarak ölçülen kan Glutation seviyeleri DM grubunda arttı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark çıktı.

Diyabetik sıçan ovaryumlarında şiddetli glukoz toksisitesinin çeşitli yolların aktivasyonu yoluyla ortaya çıktığı gösterilmiştir. Diğer çalışmalara uygun olarak, (Pala ve diğ. 2014, Erbaş ve diğ. 2014, Erbaş ve diğ. 2015), çalışmamızda DM'nin sıçan ovaryumlarında stromal fibrozis, foliküler dejenerasyon ve hemoraji gibi çeşitli olumsuz bulguları gözlemlendi. Ovaryum doku hemojenitında MDA seviyeleri diyabetik gruplarda yüksek bulundu. MDA seviyeleri en yüksek olduğunu grup- K-A(20) grubudur. Bu bir daha 20mg/kg dozda kullanılan ilacın ovaryum üzerinde toksik ve zararlı etkisine işaret etmektedir.

Bizim çalışmamızda 10 mg/kg Atorvastatin alan grupta antioksidan olarak Glutation, ovaryum doku hemojenitında daha yüksek düzeylerde bulundu, DM grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptandı ve bu bulgumuz diğer araştırmacıların Atorvastatinin antioksidan özelliklerini gösteren çalışmalarıyla uyumluydu (Parlakgümüş, 2014).

Diyabet ve oksidatif stresin üzerinde çalışan Brownlee (1995), antioksidan kullanımının iyi olacağını ileri sürmüştür: Oksidatif stresin diyabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesinde oldukça önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak eksojen olarak verilen antioksidanların bu komplikasyonların hafifletilmesinde ve/veya ortaya çıkmasının engellenmesinde yararlı olabileceği fikri ileri sürülmüş olup diyabet tedavisinde antidiyabetiklere ek olarak antioksidan maddelerin veya antioksidan özellikleri olan ajanların kullanılmasının oksidatif stresle başa çıkabilmek için gerekli olabileceği yönünde kanaat oluşmuştur (Brownlee 1995).

Pentraksin-3, uzun pentraksin ailesine ait bir inflamatuvar proteindir ve inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak inflamasyon bölgelerinin herhangi bir yerinde üretilir (Bottazi ve diğ. 2010;

Deban ve diğ. 2010). Pentraksin-3 dişilerin fertilitesi için gerekli bir protein olduğu, kümüls oophorus hücre dışı matriksin doğru entegrasyon için Pentraksin-3'e ihtiyac bulunduğu bildirilmiştir (Garlanda ve diğ. 2005). Aynı çalışmada Pentraksin-3'ün matriks biriktirme ve fibroziste rol oynadığını kanıtlamışlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda, DM grubunda Pentraksin-3, istatistiksel olarak yüksek düzeylerde bulundu ve vücutta inflamasyona sahip bölge olduğunu göstermiştir. DM grubu sıçanlarda Pentraksin-3'e yanıt olarak ışık mikroskopik düzeyde folikül sayısında ve morfolojisinde ileri derecede doku hasarı görülmemesi Pentraksin-3 artısına bağlı olarak yorumlanabileceğini düşündürdü.

Kullandığımız ilaç, 10mg/kg/g Atorvastatin, doz olan antiinflamasyon özellikleri sayesinde Pentraksin-3'ün düşmesine sebep olduğu; fakat 20mg/kg dozda ise, hem hasta hem sağlıklı grupta, Pentraksin-3 böyle bir etkiye sahip olmadığı gözlendi, bu durum bir daha, yüksek dozda Atorvastatin'in toksik etkilere sahip olabileceğini düşündürmüştür.

AMH en iyi, erkek fetüsündeki müllerian kanalların gerilemesini indükleyen bir testiküler ürün olarak bilinirken (Josso ve diğ. 2001), AMH ayrıca primer ve sekonder foliküllerin granuloza hücreleri tarafından eksprese edilir. Bu, AMH'nin erken foliküler büyümeyi kontrol etmede bir rolü olduğu ihtimalini arttırmaktadır (Durlinger ve diğ. 1999).

Soto ve arkadaşları (2009), DM'de AMH düzeylerinin daha erken azaldığını göstermiştir.

Aynı şekilde Artunc-Ulkumen ve arkadaşları (2015), kendi çalışmalarında bizim çalışmamıza benzer şekilde diyabetin, AMH ve Pentraksin-3 üzerine etkisini saptamışlardır (Artunc-Ulkumen ve diğ. 2015). Doza bağımlı kullandığımız ilaç (10 mg/kg Atorvastatin), AMH üzerinde yükseltici etki göstermiştir ve DM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olara anlamlı fark saptandı ($P<0.001$). AMH gen ekspresyon analizi RT-PCR tekniğiyle yapıldığında, en yüksek DM-A(10) grubunda bulundu ve en düşük seviye sağlıklı 20 mg/kg/g Atorvastatin alan grubunda bulundu. Bu sonucu uygun olarak, folikuler sayımında, primordiyal ve primer foliküler bu grupta [K-A(20)] en düşük bulundu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark saptandı. Atorvastatin AMH üzerinde sağlıklı gruplarda olumsuz etkisi hem kanda hem ovaryum dokusunda saptandı. Taranabilen literatürde bu konuda kısıtlı bilgi olması nedeniyle detaylı bir yorum yapamıyoruz. Yaptığımız taramalara göre, diyabet ve ovaryum üzerinde Atorvastatinin etkisi ilk defa araştırılıyor.

Birçok hücre tarafından sentezlenen TGF β hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon), adhezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre

ölümü gibi çeşitli hücrel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır. Bu büyüme faktörünün sinyalizasyon yolu birçok farklı yollar ile etkilşerek hücrenin homeostazını sağlamaktadır (Ten ve Hill. 2004, Feng ve Derynck. 2005). Bir kaskad şeklinde ilerleyen TGF β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Bu şekilde aktiflenmiş T β -RI sitozolde bulunan Smad proteinleri fosforiller (Shi ve Massague 2003). Sonrası RSmadlar Smad4'ün MH2 bölgesine bağlanırlar, RSmad/Smad4 kompleksi nukleoporinlerin aracılığı ile sitozolden nukleusa aktarılır. Nukleusta RSmad/Smad4 kompleksi 300400'e yakın genin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonu regüle eder (Kang ve diğ. 2003, Xu ve diğ. 2004).

Artunc-Ulkumen ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada Atorvastatinin TGF- β üzerindeki etkisine de bakmışlar. Bizim çalışmamızda onlardan farklı olarak, serum TGF- β seviyeleri, istatistiksel olarak fark çıkmamasına rağmen, DM grubunda biraz daha düşük bulunmuştur ve ovaryum doku kesitlerinde immunohistokimya kuantifikasyonunun sonucunda, TGF- β yüksek bulunmuştur. Normal hücrelerde TGF β 'nin başlıca fonksiyonu hücre proliferasyonunu baskılamak ve diferansiasyonu hızlandırmaktır. Epitelyal ve hematopoetik hücrelerde TGF- β antiproliferatif etkilidir ve hücre siklüsünün G1 fazında durmasını sağlamaktadır (Siegel ve diğ. 2003). İsminin aksine hücreler üzerinde antiproliferatif (hücre çoğalmasını baskılayıcı) etkisi vardır. Özellikle kanserli hücrelerde TGF- β mutasyonlu olarak bulunmuştur. TGF- β sinyal moleküllerine bağlanınca hücre içerisinde apoptoz, hücre dışı matriks yeniden düzenlenmesi, immun süpresyon ile alakalı genler aktifleştirilir (Feng ve Derynck, 2005). Literatür araştırması sırasında, TGF- β 'nin daha çok foliküllerde ve granuloza hücrelerde araştırıldığı görülmüştür (Knight ve Glistler 2006, Kristensen ve diğ. 2014). Bizim çalışmamızda, immunohistokimya tekniğiyle, TGF- β ekspresyonu matrikste görüldü. 10 mg/kg/g Atorvastatim alan gruplarda, istatistiksel bir fark olmamasına rağmen, ovaryum doku kesitlerinde immunohistokimya kuantifikasyonunun sonucunda, TGF- β daha düşük bulundu. Bu iki grupta, immunohistokimyanın sonucunu cevap olarak PCR tekniği ile elde edilen TGF- β gen ekspresyonu kontrole göre daha yüksektir (P<0.05). Farklı çalışmalarda anlatılan, TGF β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu bakarak, TGF- β protin ekspresyonun düşmesiyle, onu regulasyon amacıyla gen aktivasyonu oluşuyor. Bizim sonuçlarımızla uygun olarak TGF- β protin ekspresyonun düşük olduğu gruplarda, gen ekspresyon seviyelerinin yükselmesi takip eder. Matriks yeniden düzenlenmesi, DM grubunda yükselmiş atretik foliküllerin sayısı ve

Atorvastatin alan gruplarda değişen atretik foliküllerin sayısının Yu-Lan Chu ve ark. (2018) yaptığı çalışmada olduğu gibi TGF- β ile alakalı olabileceği düşünüyöruz.

VEGF-A, anjiyogenezin primer regülatörüdür (Dvorak 1995). Anjiyogenez üzerindeki düzenleyici etkilerinin yanında VEGF-A ayrıca folikül aktivasyonunun direkt aktivatörüdür (McFee ve diğ. 2012). VEGF-A'nın uygulanması, preovulatar foliküllerin ve sayısını ve ovulasyon sıklığını artırır ve atretik foliküllerin sayısını azaltır (Iijima ve diğ. 2005). Parlakgumus ve arkadaşlarının (2014) ovaryum üzerinde Atorvastatin kullandığı çalışmada, VEGF değerlerinin yükseldiği ve buna paralel primordial foliküllerin sayısının da yükseldiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, 10 mg/kg Atorvastatin alan gruplarda (DM, sağlıklı) VEGF ekspresyonunun yükseldiğini ve bu gruplarda atretik folikül sayısının azaldığını gözlemledik. Ancak primordial folikül sayısında bir değişiklik saptamadık. Ayrıca TGF- β ekspresyonu yüksek bulunduğu gruplarda VEGF ekspresyonu düşük çıkması dikkat çekici bir bulgudur.

Apoptoz diyabetin patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Hiperglisemi, kaspaz ailesinin üyeleri de dahil olmak üzere, apoptotik hücre ölümüne dahil olan çeşitli proteinlerin aktivasyonuna neden olur (Salvesen ve Dixit 1997). Cenk ve arkadaşları, (2017) kendi çalışmasında diyabetik sıçanların ovaryum stromal hücrelerinde kaspaz-3 immüno-ekspresyonunun, diyabetik olmayan sıçanlarla kıyasla daha yüksek olduğunu bulmuşlardır ve ovaryan stromal hücreler üzerinde DM'nin kaspaz bazlı apoptotik etkisini göstermiştir. Bizim çalışmamızda, apoptotik hücreleri TUNEL yöntemi kullanarak gösterdik. Diğer çalışmalara benzer şekilde, apoptotik hücreler ovaryan stromada görüldü ve Diyabet grubunda daha yüksek bulundu. Atorvastatin alan gruplarda, apoptotik hücre sayısı daha düşük bulundu. Özellikle 20 mg/kg/gün dozu bu parametrede doza bağımlı bir etki göstererek apoptotik hücreler daha düşük bulundu. Sağlıklı ve Atorvastatin alan gruplarda durum biraz farklıdır ve MDA seviyelere uyumlu olarak apoptotik hücreler 20 mg/kg/g alan grubunda yüksek bulundu. Apoptotik hücrelere, kontrol grubu dışında granulozada çok sık rastlanmadık. Elektron mikroskop ile incelediğimiz DM grubunda granuloza hücrelerinin sitoplazmasında bol lipid vaküollerinin varlığı yer yer de lipid içeriğinin bozularak lamellar tarzda birikimlerin olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde K-A(20) grubunda, foliküllerin granuloza hücreleri arasında bol miktarda mitotik figürlere rastlanmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, zamana göre kan glikoz düzeylerinin ölçümlerini değerlendirdiğimizde 28. gün ölçümlerinin 48. saate göre anlamlı şekilde düşük olduğunu gözlemledik. Atorvastatin almayan DM grubunda da gözlemlediğimiz bu anlamlı düşüklüğün nedeninin STZ ile oluşturduğumuz DM modeli hayvanlarda 28 güne kadar beta hücrelerinde oluşan iyileşmeden kaynaklandığını düşünmekeyiz. Atorvastatin alan DM grubu sıçanlarda kilo kaybının durduğunu gözlemledik.

DM grubunda bulunan sıçanların ölüm oranını 6/11 olarak hesapladık. Atorvastatin alan diyabetik sıçanlarda ölüm görülmemiştir. Atorvastatinin sıçanların vücut ağırlıkları ve hayata kalma oranları üzerinde anlamlı bir etkisinin olduğunu gözlemledik. Atorvastatinin bu koruyucu etkisini oluşturan mekanizmaları ortaya çıkarmak için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

DM modeli oluşturduğumuz grupların İnsulin düzeylerini değerlendirdiğimizde tedavi almayan DM grubundaki İnsulin düzeyleri kontrole göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. 10 mg/kg ve 20 mg/kg Atorvastatin alan diyabetik sıçanların İnsulin düzeyleri kontrole yakın bulunmuştur. Ancak İnsulin düzeylerindeki bu yüksekliğin kan glukoz düzeylerini anlamlı olarak etkilemediğini gözlemledik. Bu bize İnsulin direnci geliştiğini düşündürmüştür. Atorvastatinin hangi mekanizma ile İnsulin düzeylerini yükselttiği ve insülin direnci oluştuğunun anlaşılabilmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Atorvastatin alan DM sıçanlarda AMH düzeyleri Atorvastatin almayan DM sıçanlarda daha yüksek bulduk. Atorvastatinin bu koruyucu etkisini anlayabilmek için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Diyabet; kilo kaybı, yüksek trigliserid, MDA ve Pentraxin-3 seviyeleri, düşük HDL-kolesterolü gibi vücutta genel olumsuz etkilere sebep oldu.

Atorvastatin almayan DM grubu sıçanlarda serum ve ovaryumda MDA yüksek bulunmuştur. Atorvastatin alan kontrol [K-A(20)] grubunda da MDA yüksek bulunmuştur. Bu bize Atorvastatin 20 mg/kg/gün kullandığımız dozu toksik etki oluşturduğunu düşündürmüştür. 10 mg/kg Atorvastatin alan DM grubunda [DM-A(10)] ovaryum Glutatyon düzeyleri yüksek

bulunmuştur. Bu da Atorvastatinin diyabet hastalığı üzerinde antioksidan etkisinin olduğuna işaret etmektedir.

DM grubunda Pentraksin-3, istatistiksel olarak yüksek düzeylerde bulundu. 10mg/kg/gün Atorvastatin dozunun Pentraksin-3'ün düşmesine sebep olduğu; fakat 20mg/kg dozun ise, hem hasta hem sağlıklı grupta Pentraksin-3 üzerinde böyle bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi, bu durum yüksek dozda Atorvastatin'in toksik etkilere sahip olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmiştir.

Diyabetin, ovaryum üzerinde etkisini değerlendirmek üzere ovaryum kesitlerini ışık mikroskopik seviyede incelediğimizde atretik foliküller, stromada fibrotik alanlar, hemoraji ve apoptoz gibi doku hasarını gösteren bulgular gözlemledik. TEM ile yapılan incelemelerde granülosa hücre içinde lipid içeriğinin bozularak lamellar tarzda birikimi izlendi. 10 mg/kg/g dozunda Atorvastatin alan grupta doku hasarıyla ilgili bu etkilerin azaldığı ve bu dozda Atorvastatin'in koruyucu etkisi olduğunu gözlemledik.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Agarwal A and Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU International*, 2005; 95(4), 503-507.

Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation*, 2001; 103: 276–283.

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

Alberts AW, Chenj, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Alberts SG, Hensens O, Hirsfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. Mevinolin. A highly potent competitive inhibitor of hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 3957-3961.

Alemzadeh R, Wyatt DT. Diyabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. 17 edition. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2004: 1947-1972.

Almong Y. Statins, inflammation, and sepsis. *Chest*, 2004; 124: 740-3.

Altunkaynak ZB, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü; apoptoz nedir? *Tıp Araş Derg*, 2008; 6 (2): 93-104

American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2018. *Diabetes Care* 2018; 41(Suppl. 1):S13–S27.

American Diabetes Association. 8. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetesd 2018. *Diabetes Care* 2018; 41(Suppl. 1): S73–S85.

Anthony M. Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas. (13.çeviri). McGraw-Hill, New York, 2013.

Arıncı K ve Elhan A. Anatomi 1. Cilt. Güneş Kitabevi, Ankara, 2001.

Aroda VR, Christophi CA, Edelstein SL, et al.; Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of lifestyle intervention and metformin on preventing or delaying diabetes among women with and without gestational diabetes: the Diabetes Prevention Program Outcomes Study 10-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015; 100:1646–1653.

Artunc-Ulkumen B at al. Exenatide improves ovarian and endometrial injury and preserves ovarian reserve in streptozocin induced diabetic rats. *Gynecol Endocrinol*, 2015; 31:196-201.

Baigent, C., et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a metaanalysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*, 2010; 376(9753): 1670-1681.

Bakker-Arkema, R. G., Davidson, M. H., Goldstein, R. J., Davignon, J., Isaacsohn, J. L., Weiss, S. R., Keilson, L. M., Brown, W. V., Miller, V. T., Shurzinske, L. J., & Black, D. M. Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *Jama*, 1996; 275(2), 128133.

- Bang, C. N., & Okin, P. M. Statin treatment, new-onset diabetes, and other adverse effects: a systematic review. *Current Cardiology Reports*, 2014; 16(3), 1-5. Review.
- Bansal AK and Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2010; 2011.
- Barylski, M., Nikolic, D., Banach, M., P Toth, P., Montalto, G., & Rizzo, M. Statins and new-onset diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 2014; 20(22), 3657-3664.
- Bestetti GE, Junker U, Locatelli V, Rossi GL. Continuous subtherapeutic insulin counteracts hypothalamopituitary-gonadal alterations in diabetic rats. *Diabetes*, 1987; 36(11):1315-1319.
- Betteridge DJ. What is oxidative stress?. *Metabolism*, 2000; 49(2 Suppl 1): 3-8.
- Bolon B, Bucci TJ, Warbritton AR, Chen JJ, Mattison DR, Heindel JJ. Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. *Fundam Appl Toxicol*. 1997;39(1):1-10.
- Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant. *Eur Heart J*, 2003 Feb; 24(3):225-48.
- Bottazi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immuno*, 2010 ;28:157-83
- Briones AM. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stres. *Hypertension*, 2009; 54:142-149.
- Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Induction of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem*, 1978; 253: 1121-1128.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001; 414:813-820.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 2005; 54:1615-1625.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52:302-10.
- Bulut G, Kurdoglu Z, Dönmez YB ve diğ. Effects of jnk inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015; 8(8), 8774.
- Candan İ. Medikal tedavi. Antıp A.Ş. Yayınları. Ankara, 2003. p. 823-846.
- Cenk Nayki, Umit Nayki, Mehmet Kulhan, Mustafa Ozkaraca, Serdar Altun, Murat Cankaya, Oruc Alper Onk & Pasa Ulug. The effect of diabetes on ovaries in a rat model: the role of interleukin-33 and apoptosis. *Gynecological Endocrinology*, 2017; 33:9, 708-711.

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

Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 10-19.

Chan KY, Boucher ES, Gandhi PJ, Silva MA. HMG-CoA reductase inhibitors for lowering elevated levels of C-reactive protein. *Am J Health Syst Pharm*, 2004; 61: 1676-81.

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

Christians U, Jacobsen W, Floren LC. Metabolism and drug interactions of 3- hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol Ther*. 1998; 80: 1-34.

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

Culver, A. L., et al. Statin Use and Risk of Diabetes Mellitus in Postmenopausal Women in the Women's Health Initiative. *Archives of Internal Medicine*, 2012; 172(2): 144-152.

Das UN. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, 2000; 215(1), 145-152.

Davidson MH. Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia. *Expert Opin Invest Drugs*, 2002; 11:125–141.

Deban L, Russo RC, Sironi M, et al. “regulation of leucocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol*, 2010;11:328–34

Delilbaşı L. İn vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Güneş Tıp Kitabevleri, 2008.

Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer*, 2005; 5: 930-942.

Dişi üreme sisteminin genel görüntüsü.
http://www.napavalley.edu/people/briddell/Documents/BIO%20105/_ch_19_lecture_presentation.pdf

Dorostghoal M, Mahabadi MK, Adham S. Effects of maternal caffeine consumption on ovarian follicle development in wistar rats offspring. *J Reprod Infertil*, 12(1), 15-22, 2011.

D’Souza A, ve diğ. Pathogenesis and pathophysiology of accelerated atherosclerosis in the diabetic heart. *Mol Cell Biochem*, 2009; 331:89–116. Review.

Du DF, Li XL, Fang F ve diğ. Expression of anti-Müllerian hormone in letrozole rat model of polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 2014; 30(12), 885-889.

Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol*. 2008; 9:1191–1197.

Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P. Control of primordial follicle recruitment by anti-mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 1999; 140, 5789–5796.

Dvorak H.F. L.F. Brown, M. Detmar, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995; 146, pp. 1029-1039.

Eizirik DL, Colli ML and Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and β - cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009; 5(4): 219-226.

Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, ML-236C new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1976; 29: 1346- 1348.

Erbaş O. et al. Ovarian failure in diabetic rat model : Nuclear factor-kappa B, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2013; 53 (2014) 498-503.

Erbaş O, Pala HG, Pala EE, et al. Ovarian failure in diabetic rat model: nuclear factor-kappaB, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2014;53:498–503.

Erbaş O, Pala HG, Pala EE, et al. Therapeutic effect of sunitinib on diabetes mellitus related ovarian injury: an experimental rat model study. *Gynecol Endocrinol* , 2015;23:1–4.

Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji Atlası. Palme Yayıncılık. Çev. Demir R. İstanbul, 2001.

Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Pelikan Yayıncılık. 2004.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGFbeta signaling through smads. *Annu Cell Dev Biol*, 2005; 21: 659-93.

Freeman, D. J., et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus - Evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*, 2001; 103(3): 357- 362.

Fulcher, J., et al. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: metaanalysis of individual data from 174 000 participants in 27 randomised trials. *Lancet*, 2015; 385(9976): 1397- 1405.

Gannage-Yared MH, Azar RR, Amm-Azar M, et al. Pravastatin does not affect insulin sensitivity and adipocytokines levels in healthy nondiabetic patients. *Metabolism*, 2005; 54: 947–51.

Gardner DK. İn Vitro Fertilizasyon Pratik Yaklaşım. Hayat Tıp Kitapçılık. Çev: Serdaroğlu H. İstanbul, 2008.

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. “Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol*, 2005;23:337–66

- Gauthier, EL. Streptozotocin uses, mechanism of action and side effects. *Nova Science*, 2014;
- Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 1996; 19: 257-267.
- Gökmen G. Sistemik Anatomi. Güven Yayınevi, İzmir, 2003.
- Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W., et al. Enhanced Serum levels of thiobarbituric acid - reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med*, 1995; 98: 469-475
- Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014; 103(2), 137-149.
- Guyton AC ve Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. 10. Baskı. Tavaslı Matbaacılık. Çev: Çavuşoğlu H. İstanbul, 2001.
- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th edition. Elsevier Saunders, 2006.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 1999; 31(4), 261-272.
- Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 1972;48(2):422-427.
- Hawkins SM ve Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1135:10-8, Review.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 2000; 15;28(10):1456-1462.
- Hobbs HH, Brown M., Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolaemia. *Hum Mutat*, 1992; 1 445-466.
- Hsu I, Spinler SA, Johnson NE. Comparative evaluation of the safety and efficacy of HMG-CoA reductase inhibitor monotherapy in the treatment of primary hypercholesterolemia. *Ann Pharmacother*. 1995; Jul-Aug;29(7-8):743-59.
- Iijima K. , J.Y. Jiang, T. Shimizu, H. Sasada, E. Sato. Acceleration of follicular development by administration of vascular endothelial growth factor in cycling female rats. *J Reprod Dev*, 2005; 51, pp. 161-168.
- Indran M, Rokiah P, Chan SP, Kuppusamy UR. Alteration of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in young Malaysian IDDM patients. *Medical Journal of Malaysia*, 2004; 59(2):166-170.
- IDF Diabetes Atlas Group. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013." *Diabetes Res Clin Pract*, 2015;109:461-5.
- International Diabetes Federation (IDF), (Erişim: 23 Nisan 2018), http://www.diabetesforumturkey.com/document/briesfingbook_en.pdf
- İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2004; 2(3):127-136.

- Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller E, et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR Trial). *Am J Cardiol*, 2003; 92:152-60.
- Josso, N., di Clemente, N., Gouedard, L. Anti-mullerian hormone and its receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 179, 25–32.
- Jukema JW. Amlodipine and atorvastatin in atherosclerosis: a review of the potential of combination therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 2004; 5:459–468.
- Kaneto, H., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuoka, T.A.
- Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *The Review of Diabetic Studies*, 2004; 1(4), 165-174.
- Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell*, 2003; 11: 915-26.
- Kapur, N. K., & Musunuru, K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vascular Health and Risk Management*, 2008; 4(2), 341.
- Karaöz E. Özel histoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi; Isparta, 2002. p. 216-229.
- Kaul N et al. Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*, 1996; 160:283–288.
- Kawano H, Yano K. Pravastatin decreases blood pressure in hypertensive and hypercholesterolemic patients receiving antihypertensive treatment. *Circ J*, 2006 Sep; 70(9):1116-21.
- Kei A, Rizos EC, Elisaf M. Statin use in prediabetic patients: rationale and results to date. *Ther Adv Chronic Dis*, 2015; 6:246- 5.
- Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* , 2002; 25:1862– 1868
- Kim YR, Lee JS, Lee KR, Kim YE, Baek NI, Hong EK. Effects of mulberry ethanol extracts on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in pancreatic β -cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013; 33(1):128-134.
- Knight Phil G and Claire Glister. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. doi: 10.1530/rep.1.01074 *Reproduction*, 2006 August 1; 132 191-206.
- Köseoğlu MH, Fadıloğlu M, Çelik Y, Güneri S. Koroner kalp hastalığında serum malondialdehid düzeylerinde oluşan değişiklikler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1999; 77-88.

- Kristensen, S. G., et al. 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. *Molecular Human Reproduction*, 2014; 20(4): 293-308.
- Kwak B, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis; antiinflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmunity reviews* 2, 2003; 332-8.
- Lalli CA, Pauli JR, Prada PO, et al. Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. *Metabolism*, 2008; 57: 57–65.
- Lea, A. P. & McTavish, D. Atorvastatin. *Drugs*, 1997; 53(5), 828-847.
- Likidlilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *Journal of The Medical Association of Thailand*, 2010; 93(6):682-693.
- Lin S, Lin K, Li W, Zhou X, Huang T. Maternal diabetes increases apoptosis in mice oocytes, not 2-cell embryos. *Endocrine*, 2010; 37(3):460-466
- Liu CF, Liu C, Yao HH. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2010; 90:263-290, Review.
- Li Y, Tran VH, Kota BP, Nammi S, Duke CC, Roufogalis BD. Preventative effect of Zingiber officinale on insulin resistance in a high-fat high-carbohydrate diet-fed rat model and its mechanism of action, 2014 Aug; 115(2):209-15.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL ve Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994; 120: 227-237.
- Mader SS. Understanding Human Anatomy and Physiology. 5th edition, The McGraw-Hill. 2004.
- Mallinson, J. E., et al. Statin myalgia is not associated with reduced muscle strength, mass or protein turnover in older male volunteers, but is allied with a slowing of time to peak power output, insulin resistance and differential muscle mRNA expression. *Journal of Physiology-London*, 2015; 593(5): 1239-1257
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985 Jul; 28(7):412-9.
- Mayes M. The meiotic arrest of bovine oocytes. Doctora Thesis, Laval University, 2002; Quebec, Canada.
- Mazaud S, Guigon C.J, Lozach A, Coudouel N, Forest M.G, Coffigny H. et.al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology*, 2002;143(12):4775-87.

McFee R.M, T.G. Rozell, A.S. Cupp. The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFAA isoforms regulate follicle development. *Cell Tissue Res*, 2012; 349 , pp. 635-647.

McLaughlin, T., et al. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Annals of Internal Medicine*, 2003; 139(10): 802-809.

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

Moore KL, Persaud TWN. The Developing Human Clinically Oriented Embryology, 5th edition, Harcourt Brace International Edition Saunders. 1993.

Moore KL ve Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri. Çev. Dalçık H. ve Yıldırım M. İstanbul, 2009.

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

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 2004; 279(47), 49064-49073.

Nakagami H et al. Endothelial Dysfunction in Hyperglycemia as a Trigger of Atherosclerosis. *Current Diabetes Reviews*, 2005; 1, 59-63.

Naples M, Fredico LM, Xu E, Nelken J, Adeli K. Effect of rosuvastatin on insülin sensivity in an animal model of insülin resistance: evidence of statin-induced hepatic insülin sensitization. *Atherosclerosis*, 2008; 198:94-103.

Nguyen DH, Zhou T, Shu J, and Mao JH. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer InCytes*, 2013. 2(1):e.

NoctorE, CroweC, CarmodyLA, et al.; ATLANTICDIP investigators. Abnormal glucose tolerance post-gestational diabetes mellitus as defined by the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups criteria. *Eur J Endocrinol* , 2016; 175:287–297.

Oto A, Aytekin S, Özyedek Z. Türkiye kardiyoloji seminerleri. Statinlerin pleiotropik etkileri, Ekim 2003.

Ovalle WK ve Nahirney PC. Netter's Essential Histology. 2nd edition. Saunders, 2013.

Ovaryan ve uterin fizyolojik döngüleri. http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/ovarian.uterine.cycles.fig.28.22cd.jpg

Oytun Erbaş. Deneysel diyabet modelleri. *FNG & Bilim Tıp Dergisi*, 2015;1(1):40-42).

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

Öktem S, Özhan HM, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2001; 2 (1): 9195.

- Pala HG, Pala EE, Artuc, Ulkumen B, et al. The protective effect of granulocyte colony-stimulating factor on endometrium and ovary in a rat model of diabetes mellitus. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;78: 94–100.
- Parlakgumus HA et al. Atorvastatin for ovarian torsion: effects on follicle counts, AMH, and VEGF expression. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 175:186-90.
- Physicians' Desk Reference. 55th ed. Medical Economics Company, Montvale, NJ 2001; 843-846.
- Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem.* 1982, 28;311-316.
- Preiss D, Seshasai SRK, Welsh P, Murphy SA, Ho JE, Waters DD, DeMicco DA, Barter P, Cannon CP, Sabatine MS, Braunwald E, Kastelein JJP, deLemos JA, Blazing MA, Pedersen TR, Tikkanen MJ, Sattar N & Ray KK. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy. *JAMA* 305, 2011; 2556–2564.
- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*, 1963; 29:91-8.
- Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. *Molecular Endocrinology*, 2008; 22(12):2643–2654.
- Ratner RE, Christophi CA, Metzger BE, et al.; Diabetes Prevention Program Research Group. Prevention of diabetes in women with a history of gestational diabetes: effects of metformin and lifestyle interventions. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008; 93:4774–4779.
- Rees and J. C. Alcolado. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2005; 22, 359–370.
- Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med*, 1999; 31(2), 53-59.
- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Poitout, V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type-2 diabetes. *Diabetes*, 2004; 53, 119-124.
- Ross M.H. Histology: A text and Atlas. (4.Baskı). Philadelphia: Lippincott William&Wilkins, 2011.
- Ross M.H. ve Pawlina W. Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. 7th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2016.
- Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, 2001; 23: 291–299.
- Ruscica, M., Macchi, C., Morlotti, B., Sirtori, C. R., & Magni, P. Statin therapy and related risk of new-onset type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Internal Medicine*, 2014; 25(5), 401-406.
- Sadighara Melina 1,2, Zahra Amirshardost1, Mohsen Minaiyan2, Valiollah Hajhashemi2, Parvaneh Naserzadeh1, Ahmad Salimi1,3, Enayatollah Seydi1,4 and Jalal Pourahmad1. Toxicity of Atorvastatin on Pancreas Mitochondria: A Justification for Increased Risk of Diabetes Mellitus. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2017; 120, 131–137.

- Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 10th edition. Lippincott Williams and Wilkins, 2010.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997; 91:443–6.
- Sattar, N., et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*, 2010; 375(9716): 735-742.
- Scanlon VC, Sanders T. Essentials of Anatomy and Physiology. 5th edition. F. A. Davis, 2007.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology. 4th edition. Churchill Livingstone, 2009.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003; 113: 685-700.
- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003; 3: 807-21.
- Soto N, Iñiguez G, López P, et al. Anti-Mullerian hormone and inhibin B levels as markers of premature ovarian aging and transition to menopause in type 1 diabetes mellitus. *Hum Reprod*, 2009;24:2838–44.
- Sperling MA. Diabetes Mellitus in children. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson Textbook of Pediatrics. 16th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000: 1767-1787.
- Szendroedi J, Anderwald C, Krssak M, et al. Effects of high-dose simvastatin therapy on glucose metabolism and ectopic lipid deposition in nonobese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2009; 32: 209–14.
- Standring S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39th edition. Elsevier Churchill Livingstone. 2005.
- Strauss III. JF and Barbieri RL. YEN & JAFFE'S REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY, PHYSIOLOGY, PATHOPHYSIOLOGY AND CLINICAL MANAGEMENT. 7th edition. 2014.
- Sumner AE, Finley KB, Genovese DJ, Criqui HM, Boston CR. Fasting triglyceride and the triglyceride-HDL cholesterol ratio are not markers of insulin resistance in African Americans. *Arch Intern Med*, 2005;165:1395-1400.
- Takagi T, Matsuda M, Abe M, et al. Effect of pravastatin on the development of diabetes and adiponectin production. *Atherosclerosis*, 2008; 196: 114–21.
- Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A red inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001 Nov; 21(11): 1712-9. Review.
- TEMD Diyabet Çalışma Grubu. Hasta Eğitim Broşürleri Serisi- 1 DiYABET NEDİR?. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. 2018.
- Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta/Smad signaling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-73.

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

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

Trigliserid ile HDL Kolesterol oranı: <http://www.hughcalc.org/chol.php> (Erişim: 01.02.2018).

ULUDAĞ O. Diyabete Bağlı İkincil Hastalıklar (Komplikasyonlar). 2010.

Ulukaya E. Apoptozis ders notları, http://biyokimya.uludag.edu.tr/Lecture_Apopto. (Erişim: 06 Mayıs 2018).

Ulukaya E. Hücre siklusu ve apoptozis İn: Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis>. (Erişim: 06 Mayıs 2018).

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

Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS ONE*, 2014; 9(5): e96801. doi:10.1371/journal.pone.0096801.

Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 35: 1–10.

Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, et al. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu*, 1959; 7: 230–5.

Vincent AM and al. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*, 2004; 25: 612-28.

Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*, 2001; 37: 1450–7.

Waugh A ve Grant A. Ross and Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness, 9th edition, Churchill Livingstone. 2001.

What is Type 1 Diabetes? (Erişim: 23 Nisan 2018), <https://drc.ucsf.edu/types-of-diabetes/type1/understanding-type-1-diabetes/what-is-type-1-diabetes/>

What is Type 2 Diabetes? (Erişim: 23 Nisan 2018), <http://drc.ucsf.edu/types-of-diabetes/type2/understandingtype-2-diabetes/what-is-type-2-diabetes/>

Wayne TF Jr. Atherosclerosis: current status of prevention and treatment. *Int J Angiol*, 2011; 20:213-22.

Xu L, Massague J. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev mol Cell Biol*, 2004; 5: 209-19.

Yeshaya A ve diğ. Menstrual characteristics of women suffering from insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1995; 40:269-73.

Yu-Lan Chu , Ya-Ru Xu , Wan-Xi Yang , Yi Sun. The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia. *Aging*, 2018; doi.org/10.18632/aging.101391.

Yoon, D., et al. Statins and risk for new-onset diabetes mellitus: A real-world cohort study using a clinical research database. *Medicine (Baltimore)*, 2016; 95(46): e5429.

Zeuner A, Müller K, Reguszynski K, Jewgenow K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology*, 2003;59 (5-6): 1421-1433.

Zhao, W. and S. P. Zhao. Different effects of statins on induction of diabetes mellitus: an experimental study. *Drug Des Devel Ther*, 2015; 9: 6211-6223.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler:

Adı – Soyadı: Liridona Adili Osmani

Doğum yeri ve tarihi: Manastır, 09/04/1984

Uyruğu: Makedon

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: --

Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İletişim Adresi: Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Lojmanları Tıp-4 / 6 Daire:1 DO515

Telefon: 05362075377

2. Eğitim Bilgileri:

2012 – devam:Doktora: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

2003 – 2010: Lisans: Aziz Kiril ve Metodiy Üniversitesi Tıp Fakültesi, Makedonya

1998 – 2002: Lise: Mirko Mileski Lisesi

Yabancı Dil Bilgileri:

	Arnavutça	Makedonca	Türkçe	İngilizce	Sırbo-Hırvatça
Okuma	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	İyi
Yazma	Çok iyi	Çok iyi	İyi	İyi	İyi
Konuşma	Çok iyi	Çok iyi	İyi	İyi	İyi

3. Ünvanları:

Tıp Doktoru (2010)

4. Mesleki Deneyimi:

2012 – 2018: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

03-05. 2010: P&G/Grey şirketi

2006 – 2008: Medikus Tıp Dergisi

08-09. 2008: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

5. Üye Olduğu Mesleki Kuruluşlar

6. Bilimsel Etkinlikler

Seçilmiş yayınlar:

SCI-Expanded Makale:

1. Aytekin, A., Osmani, L. A., Aytekin, M. H., Yazir, Y., & Yilmaz, M. Y. The evaluation of the levels of histology self-efficacy beliefs of students of dentistry faculty. *In SHS Web of Conferences*, 2016; (Vol. 31, p. 01013). EDP Sciences.

Uluslararası Poster:

1. Yardimoglu, M., Osmani, L. A., Aytekin, A., Eraldemir, C., Acar, E., Yıldız, K., Baydemir, C. Effects of Atorvastatin on the Renal Tissue in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017) in May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey.

Aldığı Burslar:

07-11. 2017: 216S346 no'lu TÜBİTAK projesindeki görevim dolayısıyla

Projeler:

Atorvastatin'in diyabetik sıçan ovaryumları üzerinde histolojik ve biyokimyasal etkilerinin incelenmesi, TÜBİTAK 1002, Proje no: 216S346, Bursiyer

