T.C. KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON BAŞKANLIĞINA
PROJE SONUÇ RAPORU FORMU

A-GENEL BİLGİLER

PROJE NO:2016/079

PROJE ALANI:

TEMEL BİLİMLER ☐ TEKNOLOJİ ☐ **SAĞLIK** ☐ SOSYAL ☐

PROJE BAŞLIĞI: "*Atorvastatin'in diyabetik sıçan ovaryumları üzerinde histolojik ve biyokimyasal etkilerinin incelenmesi*"

1. PROJE PROGRAM ADI

Akademik Çalışmaları ve Eğitim Altyapısını Destekleme Programı (A)	
A-1-Eğitim ve Öğretim Kalitesini Geliştirme Projeleri	
A-2-Lisansüstü, Tıpta Uzmanlık ve Sanatta Yeterlilik Tezlerini Destekleme Projeleri	
A-3-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma - Geliştirme Projeleri	**X**
Disiplinler arası işbirliği (B)	
B-1-Çok Disiplinli Bilimsel ve Teknolojik Araştırmaları Destekleme Projeleri	
Yerele yönelik projeler (C)	
C-1-Bölgesel Sorunların Çözümlerini Destekleme Projeleri	
C-2-Bölgenin Sosyal ve Kültür Yapısını Araştırma Projeleri	

2. PROJE EKİBİ

	ıvanı, Adı Soyadı	**Fak./Enst./YO/MYO/Arş. Merkezi**	**Bölüm/ Anabilim Dalı**
Proje Yürütücüsü	Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz	Tıp Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacı	Liridona Adili Osmani	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacı	Doç. Dr. Yusufhan Yazır	Tıp Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacı	Yard. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir	Tıp Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyokimya
Araştırmacı	Prof. Dr. Feriha Ercan	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

1. İÇİNDEKİLER: **sayfa no:**

Şekil-1……
Şekil-2……
Şekil-3……
Şekil-4……
Şekil-5……
Şekil-6……
Şekil-7……
Şekil-8……
Şekil-9……
Şekil-10……

Tablo-1……
Tablo-2……
Tablo-3……
Tablo-4……
Tablo-5……

Çizelge-1……
Çizelge-2……
Çizelge-3……

2. ŞEKİL, TABLO ve ÇİZELGE LİSTELERİ: Şekiller, tablolar ve/veya çizelgeler, raporda kullanıldıkları sıraya göre listelenir. Şekiller, tablolar ve/veya çizelgelerin bir arada kullanıldığı metinlerde bu listeler ayrı ayrı oluşturulmalıdır.

3. TÜRKÇE ÖZET:

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 vd. 2009). DM'li kadınlarda menarşda gecikme ve menstrual düzensizliklerin yaygınlığı, aynı yaştaki diabetik olmayan kadınlardan daha fazla görülmüştür; bunun da daha sonraki doğurganlık bozukluklarını içerdiği bildirilmiştir (Yeshaya vd,1995).
Diyabete bağlı infertilitenin diyabetin komplikasyonları arasında yer aldığı bilindiği için projemizde infertiliteye neden olan ovaryum dokusundaki yapısal değişimler incelendi ve bu değişimlere karşı Atorvastatin etken maddesini içeren bir ilaç tedavisi alan grup ile karşılaştırıldı.
Deneyler, streptozosin (STZ) ile diyabetik hale getirdiğmiz Wistar Albino sıçanlar üzerinde yapıldı. Tedavi grubu sıçanlara Atorvastatin etken maddesini içeren bir ilaç 21 gün süre iki farklı dozda (10mg/kg/gün ve 20mg/kg/gün) verildi. Deney sürelerinin sonunda alınan kan ve ovaryum dokularında biyokimyasal ve histolojik incelemeler yapıldı. Biyokimyasal olarak kan örneklerinde Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH), Pentraxin (PTX3), Transforming Growth Factor β (TGF β), Anti Müllerian Hormone (AMH), Insulin, plazma total kolesterol düzyeleri belirlendi. Ovaryum doku örneklerinde ise yine MDA ve GSH düzeylerine bakıldı. Histolojik incelemeler ise iki farklı mikroskopta değerlendirildi: a) Işık mikroskobunda seri kesitler H&E, PAS ve Mason trikrom ile boyanarak rutin incelemeler yapıldı. Ayrıca doku kesitlerimizde, VEGF ve TGF β immunohistokimya tekniği ile incelendi. İlaveten TUNEL kiti ile apoptozis değerlendirildi. b) Elektron mikroskobik incelemeler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında transmisyon elektron mikroskobunda yapıldı.Diyabetin sıçan ovaryumları üzerindeki olumsuz etkileri ve Atorvastatin'in bu etkilere karşı koruyuculuğu değerlendirilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Diabetik sıçan. Atorvastatin. Ovaryum. Oksidatif stres. Apoptozis. Antioksidan enzimler. Mikroanjiyopati

4.İNGİLİZCE ÖZET:

Diabetes mellitus (DM) is defined as a chronic metabolic disease that requires continuous medical care where the body can not make use of carbohydrates, fats and proteins due to insulin deficiency or insulin deficiency defects (D'Souza et al., 2009). Late menarche and prevalence of menstrual irregularities in DM women were more common than non-diabetic women of the same age; it was reported to include later fertility disorders (Yeshaya et al., 1995).
Because diabetic infertility is known to be one of the complications of diabetes, structural changes in ovarian tissue causing infertility in our pro- cess have been studied and compared with those receiving a drug treatment containing atorvastatin agent.
Experiments were performed on Wistar Albino rats we diabetic with streptozosin (STZ). The treatment group received two different doses (10 mg / kg / day and 20 mg / kg / day) of a drug containing atorvastatin agent for 21 days in rats. Biochemical and histological examinations were performed in blood and ovarian tissues at the end of the experimental period. Biochemically, Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH), Pentaxin (PTX3), Transforming Growth Factor β (TGFβ), Anti Müllerian Hormone (AMH), Insulin and plasma total cholesterol levels were determined in blood samples. MDA and GSH levels were also measured in the ovarium tissue specimens. Histological examinations were evaluated on two different microscopes:

a) In the light microscope, serial sections were stained with H & E, PAS and Mason tricrome, and routine examinations were performed. In addition, in our tissue sections, VEGF and TGF were examined by immunohistochemical technique. In addition, apoptosis was assessed by TUNEL kit.
b) Electron microscopic studies were performed in transmission electron microscope at Marmara University Faculty of Medicine Histology-Embryology Department. In the project, diabetic adverse effects on rat ovaries and the protection of atorvastatin against these effects are evaluated.

Key Words: Diabetic rat. Atorvastatin. Ovary. Oxidative stress. Apoptosis. Antioxidant enzymes. microangiopathy

5.GİRİŞ:

a) Diabetes mellitus (DM): dünya çapında 180 milyondan fazla insanı etkileyen kronik metabolik bir hastalıktır. Kronik dejeneratif komplikasyonlar, en ciddi sağlık sorunlarına sebep olamaktadır. Ovaryum rezervi ve fonksiyonu, özellikle diyabetik kadınlar için fertilite, kalp-damar sorunları ve osteoporoz için önemli bir role sahip olduğu iyi bilinmektedir. Diyabetik kadınların yaklaşık % 33'ünde

adet düzensizliği olduğu ve diyabeti olmayan kadınlara göre, daha erken yaşta menopoza girdikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada, sıçan modellerinde glikoz toksisitesinin ovaryumlardai hasarlanma şiddeti ve atorvastatinin tedavisinin biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmesi araştırılması amaçlandı. Hipergliseminin doku hasarını 5 major mekanizma ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bunlar; poliol yolu üzerinden glikoz ve diğer şekerlerin artmış çözülmesi, ileri glikasyon ürünlerinin (AGE - advanced glication end products) intrasellüler artışı, AGE ve onun aktive ligandları için artmış reseptör ekspresyonu, protein kinaz-C izoformlarının aktivasyonu ve heksozamin yolunun aşırı aktivasyonudur (Brownlee, 2005). Bu 5 mekanizma sadece mitokondrial aşırı yüklenme ve buna bağlı oluşan serbest oksijen radikalleri (ROS) ile açıklanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda ROS'un ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir. Bu bakış açısından, antioksidan aktivitesinin STZ ile oluşturan DM gelişimini ve ilerlemesini geciktirebileceği ya da önleyebileceğini düşünmekteyiz.

b) Atorvastatin: Statinler, kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı adımı katalize eden 3-hidroksi-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleridir. HMG-CoA enzimi kolesterol düşürücü maddelerin geliştirilmesi için önemli bir hedef haline gelmiştir. Son yıllarda onların sadece lipid düşürücü statin etkilerini değil, aynı zamanda anti-inflamatuar özellikleri ateroprotektif etkilerinden sorumlu olabileceğini gösteren kanıtlar birikmiştir (Jukema & van der Hoorn, 2004). Hiperkolesteromik sıçanlarda Atorvastatin'in oksidatif markırlar, nitrik oksit ve homosistein değişimini de azalttığı (Amin ve Abd El-Twab, 2009) ve anjiotensin-II ile uyarılan vasküler remodelling ve oksidatif stresi önlediği (Briones vd, 2009) bildirilmiştir.
Son raporlar, statinler anjiyotensin II kaynaklı NADPH oksidaz aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla vasküler hücrelerde ROS üretimini inhibe edebileceğini ortaya çıkmıştır. Statinler aynı zamanda yüksek glikoz kaynaklı NADPH oksidaz aktivasyonunu inhibe edebilir ve diyabette ROS üretiminde artışını önleyebilir(Nakagami vd, 2005)

Ancak, diyabetik sıçan ovaryumlarda atorvastatinin etkisi henüz diyabetik sıçanlarda araştırılmamıştır. Bu nedenle Atorvastatin'in antioksidan aktivitesinin STZ ile oluşturan DM gelişimini ve ilerlemesini geciktirebileceği ya da önleyebileceği hipotezini kurduk.

6.MATERYAL VE YÖNTEM:
Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 09 Temmuz 2015 tarihli ve KOU HADYEK: 7/12-2015 sayılı onay alındı, tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

a) Deney Hayvanları. Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden 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 verildi.

Sıçanlar başlangıçta kontrol ve deney grubu olarak ikiye ayrıldı;

Kontrol grupları

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

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

a) Kontrol + 10mg/kg/gün Atorvastatin, (K-A10) oral gavage yolu ile sağlıklı normal hayvanlara (diyabetik hayvanlara uygulanan tedavi ile senkronize zamanlarda 21 gün süreyle verildi). (Parlakgumus vd., 2014).

b) Kontrol + 20mg/kg/gün Atorvastatin, (K-A20) oral gavage yolu ile sağlıklı normal hayvanlara, diyabetik hayvanlara uygulanan tedavi ile senkronize zamanlarda 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus vd., 2014).

Deney grupları

3) Diyabet grubu (n=11): (DM) STZ, 60 mg/kg dozda (0.1 M, pH 4.0, 1 ml sitrat buffer içinde) i.p. tek doz olarak verildi. (Erbaş vd, 2013; Artunc-Ulkumen vd, 2014).

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

a) Diyabet + 10mg/kg/gün Atorvastatin grubu (n=12): Diyabetik sıçanlara oral gavage yolu ile Atorvastatin (10mg/kg/day) 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus vd, 2014).

b) Diyabet + 20mg/kg/gün Atorvastatin grubu (n=12): Diyabetik sıçanlara oral gavage yolu ile Atorvastatin (20mg/kg/day) 21 gün süreyle verildi (Parlakgumus vd, 2014).

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

b) 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 batınları açılarak sağ ve sol ovaryumları alındı.

c) Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

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

d) Glukoz seviyenin ölçümü

Glükoz sevyiesi, ilaç uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra ve sakrifiye etmeden önce ölçüldü. Kuyruk ucundan alınan kanda glukoz ölçüm cihazı (Optimum Xceed) ile eide edilen sonuçlar keydedildi.

e) Ovaryum Ağırlıklarının Ölçümü

Sakrifikasyonu takiben, çevre dokulardan iyice temizlenen ovaryumların ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı. Sağ ovaryumların yarısı biyokimyasal analizler için salin ile yıkanarak paketlendi ve kullanılıncaya kadar -40 ºC'de saklandı, diğer yarısı elektron mikroskopi incelemeleri için %2,5'lik gluteraldehit çözeltisine alındı. Sol ovaryumlar ışık mikroskopi incelemeleri için rutin histolojik doku takibi uygulanmak üzere %10'luk tamponlanmış formaldehit içerisine alındı.

f) Biyokimyasal Analiz

Kalpten alınan kan örneklerinde KOÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında serum MDA, GLUTATION, TGF-beta, INSUIN seviyeleri ile plazma AMH ve PENTRAXİN seviyeleri belirlendi. Aynı şekilde ovaryum dokusunda da MDA, GLUTATION seviyeleri tespit edildi.

-**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 vd, 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 kullanıldılar.

-**Dokuda Protein Tayini**

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

- Kanda Trigliserid, Kolesterol, TGF-beta, AMH, PENTRAXIN, INSULIN, MDA ve GLUTATION Tayini

- TRIGLISERID ve KOLESTEROL Ölçümü

Kardiyak ponksiyon ile alınan kan örnekleri pıhtılaşma amacıyla 10-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 2000-3000 RPM'de yaklaşıl 20 dk sentrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatlice toplandı. Çıkarılan özüt –20°C'de muhafaza edildi. Elde edilen serumda Trigliserid ve Kolesterol seviyeleri rutin biyokimya otoanalizörü ile ölçüldü.

- TGF-beta, AMH Pentraxin ve İNSULİN Ölçümü

Kandan elde edilen plazma örneklerinde TGF-beta, AMH, Pentraxin ve INSULIN, ELISA kiti kullanılarak çalşıldı. Çalışma kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

- Malondialdehit Ölçümü

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

g) 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 serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24 saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dk süreyle tutuldu ve ksilen içinde 30 dk süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56-58°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 üzerinde hematoksilen&Eozin, Mason trikrom, PAS boyamaları (Dorostghoal vd, 2011) ve TGF-beta, VEGF immünohistokimyası, TUNEL boyaması yapıldı.

h) Hematoksilen-Eozin Boyaması ile Morfolojik Değerlendirme

Parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün ksilen (2 saat) yardımı ile kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100^0, 96^0, 90^0, 70^0) geçirildi ve saf suya alındı. Ardından Mayer Hematoksilen'de 5 dk bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyanın giderilmesi için iki kere sudan geçirilen kesitler asetık alkol 10-15 saniye (sn) bekletildi 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 ksılolde ikişer kez 15'er dk bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

ı) Folikul sayımı

H&E ile boyanan kesitlerde folikül sayımı yapılırken, aynı foliküllerin tekrar sayılmasını engellemek için 5 seviyede bir alınan kesitlerde ayrı ayrı folikül sayımı yapılıp toplandı ve total ovaryumdaki ortalama folikül sayısı hesaplandı. Foliküller primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, Graaf folikülü, korpus luteum, atretik ve kistik folikül olarak sınıflandı ve gruplar arasında folikül sayıları ile bu foliküllerin morfolojik özellikleri değerlendirildi (Du vd, 2014; Bulut vd, 2015). Atretik foliküller; granüloza hücre tabakalarında birden fazla piknotik çekirdek, antral kavitede granüloza hücrelerin varlığı, granüloza hücrelerin bazal membrandan ayrılması, dejenere oosit, kalınlaşmış ve dejenere olmuş zona pellusida özellikleri ile ayırt edildi (Dorostghoal vd, 2011).

Analiz için kullanılan folikül gelişim aşamalarının sınıflandırılması (Myers et al, 2004).

(a) Primordial foliküller, skuamöz (tek katlı yassı) granüloza hücreleri (ok) ile çevrelenmiş bir oosit (o) olarak tanımlanmıştır. Bazı skuamöz granüloza hücreleri ile çoğunlukla küboidal granüloza hücrelerine (ok başı) sahip olan foliküller primer olarak sınıflandırılmıştır. Bar ¼ 20 mm.

(b) Primerl foliküller, tek katlı küboidal granüloza hücresi (ok) ile çevrelenmiş bir oosite sahiptir. Ölçü çubuğu: ¼ 20 mm.

(c) Sekonder foliküller, görünür antrum bulunmayan, birden fazla kübik granüloza hücresi tabakasıyla çevrilmiştir. Ölçü çubuğu: 50 mm.

(d) Erken antral foliküller gelişmekte olan antral boşluklara (ok) sahipken, antral foliküller (e) belirgin bir antral boşluğa (ok) sahiptir. Ölçü çubuğu: 100mm.

(f) Preovulatuar foliküller foliküler tiplerin en büyüğü idi ve kümülüs granüloza hücre tabakasına (ok başı) sahiptir. Ölçü çubuğu: 200 mm.

(g) Sağlıklı foliküller (ok) ve son evre atretik folikülleri (ok başı) temsil eden ZPR'lerin ZP'si. Ölçü çubuğu: ¼ 100 mm.

(h) Kolayca komşu kan damarlarından ayırt edilir (ok), ZPR (ok ucu) yüksek büyütme. Ölçü çubuğu: ¼ 100 mm.

i) İmmünohistokimyasal Uygulamalar

Parafin bloklardan alınan seri kesitlerde foliküllerdeki immünohistokimyal boyamalar ve foliküllerdeki apoptotik hücrelerin belirlenmesinde TUNEL kiti protokollerine göre yapıldı.

-**TGF-beta İmmünohistokimyası**

Parafin bloklardan polilizinli lamlar üzerine alınan 4 µm'lik kesitlerin 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ksilende 3'er kez 5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Ardından, sırasıyla 2x5 dk 100° alkolde, 1x5 dk 96° alkolde, 1x5 dk 90° alkolde, 1x5 dk 70° 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 H_2O_2'de 5 dk bekletildi. 2 kez PBS'de yıkanan lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalem ile çizilerek havuz oluşturuldu.1 kez T-PBS'de yıkanan kesitlere özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 5 dk protein blok solüsyonu uygulandı. Ardından kesitlere 1/200 dilusyonundaki TGF-beta antikoru uygulandı ve +4 °C'ta gece boyunca bekletilerek primer antikor uygulaması yapıldı. 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk biyotinlenmiş sekonder antikor 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.

- VEGF İmmünohistokimyası. VEGF için yapılan immünohistokimya uygulamasında TGF-beta immün boyaması sırasında tarif edilen basamaklar izlendi. kesitlere 1/50 dilusyonundaki VEGF primer antikoru uygulandı. ve +4 °C'ta gece boyunca bekletilerek primer antikor uygulaması yapıldı. 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda 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.

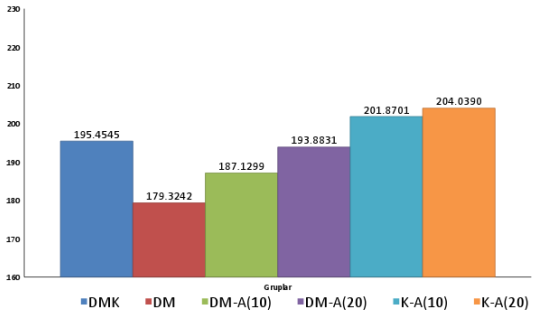
-**TUNEL Boyaması.** Parafin bloklardan alınan 4 µm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından toluolde 3x10 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirilip 5 dk PBS'de yıkandı. Daha sonra antijen iyileleştirme 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 H_2O_2'de 5 dk karanlıkta bekletildi. PBS (2x5 dk) ile çalkalandıktan sonra lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilerek havuz oluĞturuldu ve kesitlere 10 dakika 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 medyumu ile kapatıldı. Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile tüm folikül çeşitleri incelendi. Sekonder ve Graaf foliküllerindeki teka ve granüloza hücrelerinde görülen immünoreaktif nükleuslar ayrı ayrı sayıldı. İşaretlenen hücrelerin toplam hücre sayısına bölünmesi ile foliküllerdeki teka ve granüloza hücrelerin apoptotik indeksi hesaplandı (Kilic vd, 2012).

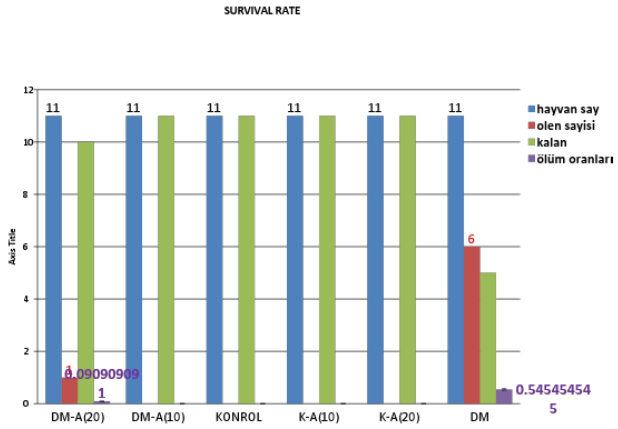
j) Elektron mikroskop. Elektron mikroskobu incelemeleri için sıçanların ovaryum dokuları alındı %4'lük soğuk gluteraldehit solüsyonu içerisine kondu. Ardından +4 °C'de 2 gün tespit edildi. Sertleşen dokular, temizlenmiş jilet yardımı ile 1mm3'lük parçalar halinde getirildi.

k) Istatistiksel Analiz. Istatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değiÇkenler ortalama +/- standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25. persantil - 75. Persantil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değiÇkenler için tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA), normal dağılıma sahip olmayan nümerik değiÇkenler için ise Kruskal Wallis Testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey, Dunnett ve Dunn testleri kullanıldı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlılık için yeterli kabul edildi

7.BULGULAR

a) Vücut Ağırlığı. Vücut ağırlıklarında; DM grubunda anlamlı dercede düşme ve Atorvastatin tedavi gruplarında düzelme gözlendi.



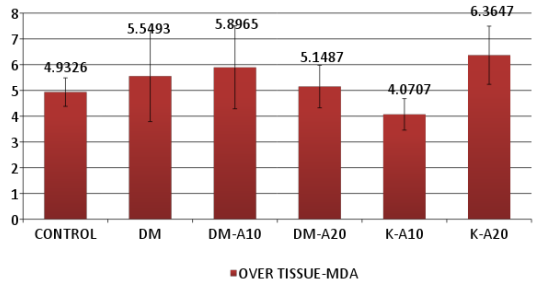


b) Makroskobik Bulgular:
Hayvanlar sakrifiye edilmeden önce ve sonra vücutta ve organlarda bazı makroskopik değişiklikler fark edildi. 

Diyabet-Atorvastatin 10 mg (DM-A 10 mg) grubunda, dişlerde uzama ve ağız mukozasında ve boyun bölgesinde lezyon izlendi. DM ve DM-A 10 mg grubunda megakolon benzeri görünüm, perikardiyumda fibroz farklılaşma ve akciğerlerde fibrotic görünüm izlendi. DM grubunda perikardiyumda seröz sıvı gözlendi.

c) Biyokimya sonuçları:
Deney sonunda kalpten alınan kan örneklerinden Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH), Pentraxin (PTX3), Transforming Growth Factor β (TGF β), Anti Müllerian Hormone (AMH) ve plazma total kolesterol düzyeleri belirlendi.

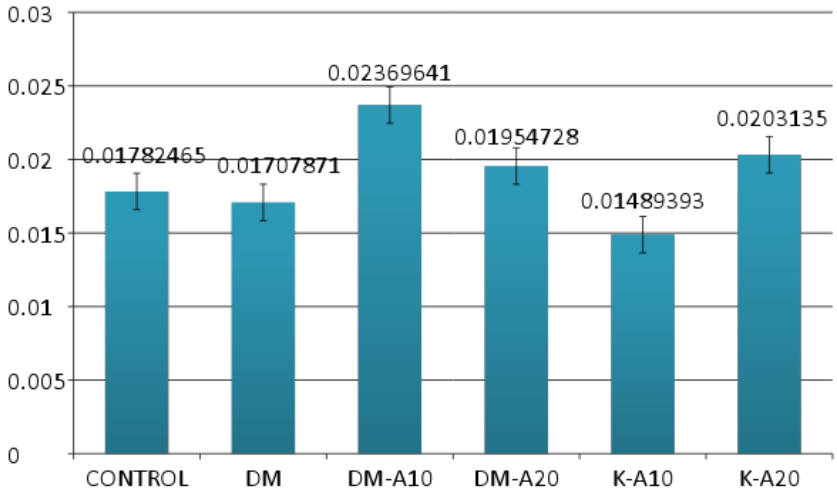
-Ovaryum dokusunda MDA düzeyleri;



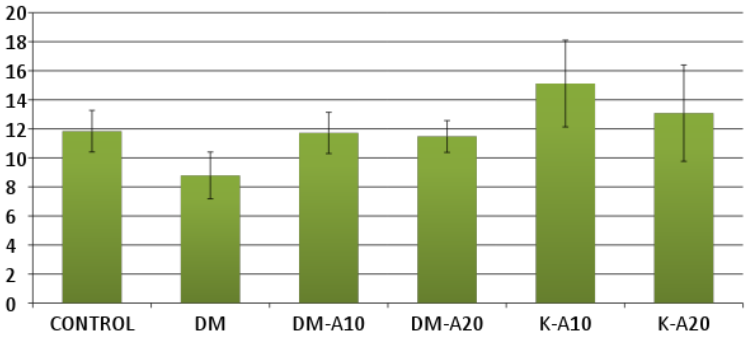
Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında doku MDA seviyelerinin karşılaştırılması. p<0.03; DM-A10 K-A20 grubu ile kıyaslandığında. *p<0.04; K-A10 K-A20 grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DOKU_GSH	Between Groups	,000	5	,000	4,492	,002
	Within Groups	,001	42	,000		
	Total	,001	47			
DOKU_MDA	Between Groups	25,730	5	5,146	3,708	,007
	Within Groups	58,295	42	1,388		

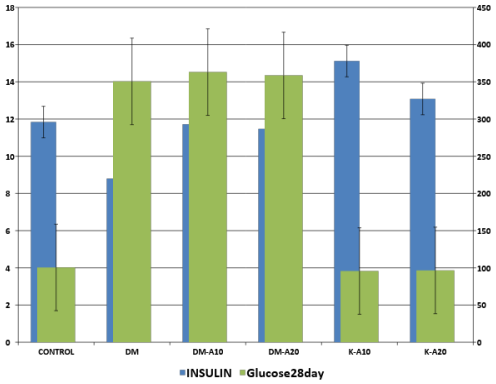
- **Ovaryum dokusu Glutation düzeyleri:**

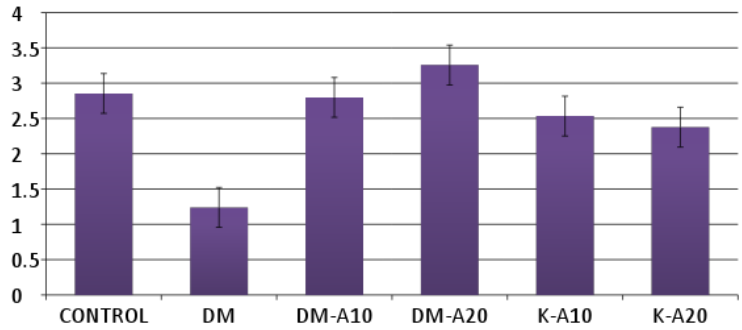


Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında doku GLUTATION seviyelerinin karşılaştırılması. p<0.02; DM DM-A10 grubu ile kıyaslandığında. p<0.01; K-A10 DM-A10 grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

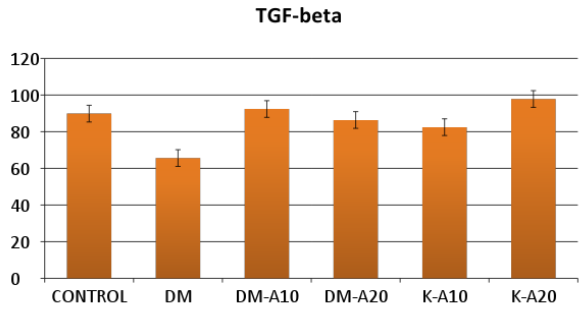


Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında INSULIN seviyelerinin karşılaştırılması. p<0.04; Kontrol K-A10 grubu ile kıyaslandığında. p<0.00; K-A10 DM grubu ile kıyaslandığında. p<0.003 K-A20 DM grubu ile kıyaslandığında, . p<0.003 K-A10 DM-A10 grubu ile kıyaslandığında, . p<0.01 K-A10 DM-A20 grubu ile kıyaslandığında Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

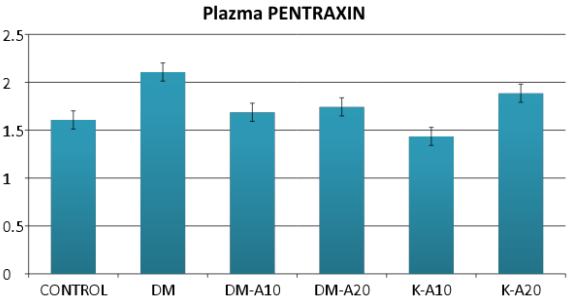




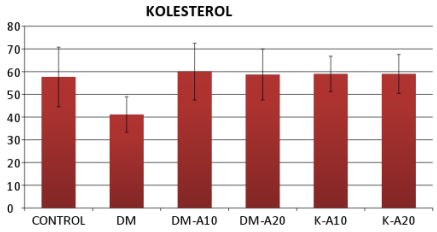
Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında AMH seviyelerinin karşılaştırılması. p<0.001 Kontrol DM grubu ile kıyaslandığında. p<0.001 DM DM-A10, p<0.000 DM DM-A20, p<0.009 DM K-A10, p<0.002 DM K-A20 grubu ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.



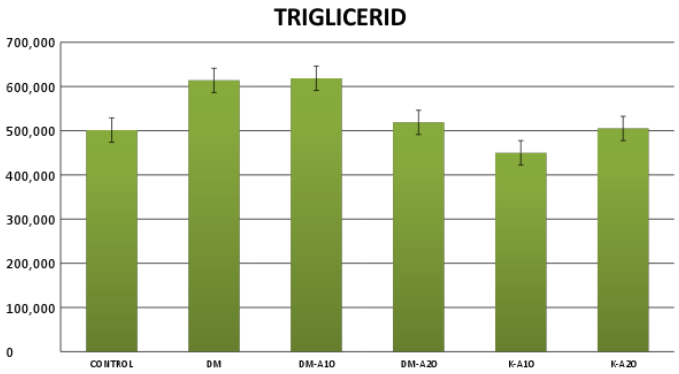
Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında TGF-beta seviyelerinin karşılaştırılması.



Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında plazma PENTRAXIN seviyelerinin karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.



Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında KOLESTEROL seviyelerinin karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.



Kontrol, Diyabet ve tedavi gruplarında TRILICERID seviyelerinin karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X)±standart hata (SE) olarak ifade edildi.

d) Mikroskobik Bulgular:

Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinde foliküllerin gelişim aşamalarına göre değerlendirmesi yapıldı. Kontrol grubuna göre DM grubu sıçanların ovaryum foliküllerinde bazı histolojik değişimler belirlendi (Şekil-X)

Şekil-A. H&E ile boyanmış , farklı gruplara ait sıçan ovaryumlarının farklı tip folliküllerindeki histolojik değişimler/atretik belirtiler (folikül biçinde değişim, granüloza hücrlerinde ayrılma, zona pellusida'da incelme, oositin şeklinde bozulma, dejenerasyon) görülüyor.

(a) Primordial foliküller, skuamöz (tek katlı yassı) granüloza hücreleri (ok) ile çevrelenmiş bir oosit (o) olarak tanımlanmıştır. Bazı skuamöz granüloza hücreleri ile çoğunlukla küboidal granüloza hücrelerine (ok başı) sahip olan foliküller primer olarak sınıflandırılmıştır. Ölçü Çubuğu:20 mikrometre.

(b) Primerl foliküller, tek katlı küboidal granüloza hücresi (ok) ile çevrelenmiş bir oosite sahiptir. Ölçü çubuğu: 20 mikrometre.

(c) Sekonder foliküller, görünür antrum bulunmayan, birden fazla kübik granüloza hücresi tabakasıyla çevrilmiştir. Ölçü çubuğu: 50 mikrometre.

(d) Erken antral foliküller gelişmekte olan antral boşluklara (ok) sahipken, antral foliküller (e) belirgin bir antral boşluğa (ok) sahiptir. Ölçü çubuğu: 100 mikrometre.

(f) Preovulatuar foliküller foliküler tiplerin en büyüğü idi ve kümülüs granüloza hücre tabakasına (ok başı) sahiptir. Ölçü çubuğu: 200 mikrometre.

(g) Sağlıklı foliküller (ok) ve son evre atretik folikülleri (ok başı) temsil eden ZPR'lerin ZP'si. Ölçü çubuğu: 100 mikrometre.

(h) Kolayca komşu kan damarlarından ayırt edilir (ok), ZPR (ok ucu) yüksek büyütme. Ölçü çubuğu: 100 mikrometre.

Diyabetik sıçanların ovaryum dokusunda, kontrol grubu normal sıçanlarla karşılaştırıldığında; foliküler dejenerasyon, stromal yapıda değişme ve fibrozis değerlendirildi. Diyabetik sıçanlarda ovaryumun histolojik yapısı ve stromal inflamasyon değerlendirildi.

Şekil-B. H&E ile boyanmış, farklı gruplara ait sıçan ovaryumlarında histolojik değişimler; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda foliküler dejenerasyon, stromal değişimler, fibrotik alanlar, lökositik infiltrasyon (ok) dikkati çekiyordu.

Şekil-C. Farklı gruplara ait sıçan ovaryumlarında VEGF(+) boyanan hücreler özellikle DM grubunda dikkati çekiyordu.

Şekil-D. Farklı gruplara ait sıçan ovaryumlarında TGF-β (+) boyanan hücreler özellikle DM grubunda dikkati çekiyordu.

Şekil-E. Farklı gruplara ait sıçan ovaryumlarında TUNEL(+) boyanan apoptik hücreler (ok) özellikle DM grubunda dikkati çekiyordu.

Elektron mikroskobunda ovaryum dokusunun ultrastrüktürel olarak (kan damarların bazal laminasında incelme olup olmadığı) değerlendirilmektedir.

8.TARTIŞMA ve SONUÇ

Myers vd (2004), Fare ovaryumunda foliküler sayıların belirleme yöntemleri üzerinde çalışmışlardır. Bu araştırmacılar, ovaryan folikküllerin sayısının gelişimin çeşitli aşamalarında doğru olarak tahmin edilmesinin oositlerin ve bunların destekleyici folliküler hücrelerinin büyümesini ve olgunlaşmasını kontrol eden endokrin sinyalleri ve parakrin / otokrin mekanizmaları ile ilişkili olarak folikülojenez sürecinin önemli bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Folikül sayısındaki farklılıkların kontrol ve deney koşullarında ovaryum işlevinin yorumlanmasında bir metot olduğunu düşünerek biz de tez çalışmamızda deney gruplarımızda folikül sayımlarımız arasında istatistiksel olarak farklılık belirledik.

9.TEŞEKKÜR

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine **"Teşekkür"** ederiz.

10.KAYNAKLAR

1. Amin KA ve Abd El-Twab TM. 2009. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolimic rats: role of atorvastatine and cinnamon. Int. J Clin Exp Med, 5;2(3):254-65.
2. Artunc-Ulkumen B et al.. 2015. “Exenatide improves ovarian and endometrial injury and preserves ovarian reserve in streptozocin induced diabetic rats”, Gynecol Endocrinol, 31:196-201.
3. Briones AM, 2009. “Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stres”, Hypertension, 54:142–149.
4. Browrlee M.1995 The pathological implications of protein glycation. Clin Invest Med; 18: 275-81.
5. Brownlee M. 2001.”Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications”, Nature, 414:813–820).
6. Brownlee M. 2005. “The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism”, Diabetes, 54:1615–1625.
7. Buege JA, Aust SD. 1978. “Microsomal lipid peroxidation”, Methods Enzymol, 52:302-10.
8. Bulut G, Kurdoglu Z, Bozdemir Dönmez Y, Kurdoglu M, Erten R. Effects of jnk inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(8): 8774–8785.
9. Calkins CM, Bensard DD, Heimbach JK, et al. 2001. “L-arginine attenuates lipopolysaccharşde induced lung chemokine production”, Am. J. Phusiol. Lung Cell Mol. Physiol, 280(3):L400-408.
10. D’Souza A, Hussain M, Howarth FC,Woods NM, Bidasee K, Singh J. 2009. “Pathogenesis and pathophysiology of accelerated atherosclerosis in the diabetic heart”, Mol Cell Biochem, 331:89–116.
11. Dorostghoal M, Mahabadi MK, Adham S. Effects of Maternal Caffeine Consumption on Ovarian Follicle Development in Wistar Rats Offspring. J Reprod Infertil. 2011;12(1):15-22.
12. Du vd, 2014.
13. Erbaş O. Deneysel diyabet modelleri. FNG & Bilim Tıp Dergisi 2015;1(1):40-42).
14. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 1972 Aug;48(2):422-7.
15.
16. İrer SV, Alper G.2004 Deneysel diyabet modelleri. Turk Klinik Biyokimya Derg 2004;2:127-36.
17. Jukema JW, van der Hoorn JW. 2004 “Amlodipine and atorvastatin in atherosclerosis: a review of the potential of combination therapy”, Expert Opin Pharmacother, 5:459–468.
18. Kaul N et al (1996) ‘Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy.’ Mol Cell Biochem 160:283–288.
19. Kilic vd, 2012.
20. Lenzen S. 2008 The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia;51:216-26.
21. McFee RM, Cupp AS. 2013. “Vascular contributions to early ovarian development: potential roles of VEGFA isoforms”, Reprod Fertil Dev, 25:333-42.
22. Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T and Morishita R. 2005 . “Endothelial Dysfunction in Hyperglycemia as a Trigger of Atherosclerosis”, Current Diabetes Reviews, 1, 59-63.

23. Nilsson EE, Doraiswmy V, Skinner M. 2003. “Transforming Growth Factor-beta Isoform Expression During Bovine Ovarian Antral Follicle Development”, Molecular Reproduction and Development, 66:237–246.

24. Parlakgumus HA et al. 2014. “Atorvastatin for ovarian torsion: effects on follicle counts, AMH, and VEGF expression”, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,175:186-90.

25. Raja-Khan R and al. 2014. “The Role of TGF-β in Polycystic Ovary Syndrome”, Reproductive Sciences, 21(1): 20-31).

26. Rees and J. C. Alcolado,2005. Animal models of diabetes mellitus Diabet. Med. 22, 359–370 (2005).

27. D. A. Rees and J. C. Alcolado, 2005. Animal models of diabetes mellitus Diabet. Med. 22, 359–370

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

29. Yeshaya A vd, 1995. “Menstrual characteristics of women suffering from insulin-dependent diabetes mellitus”, Int J Fertil Menopausal Stud., 40:269-73.