

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ) ANABİLİM
DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

**DİYABETİK SIÇANLARIN TESTİS DOKULARINDA
FUKOİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Onur ERSOY

EDİRNE – 2016

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ) ANABİLİM
DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

**DIYABETİK SIÇANLARIN TESTİS DOKULARINDA
FUKOİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Onur ERSOY

**Destekleyen Kurum: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından
114S153 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No :

EDİRNE – 2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Onur ERSOY tarafından tez başlığı "Diyabetik Sıçanların Testis Dokularında Fukoidan Etkilerinin Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı/..../..... tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Prof. Dr. Turan KARACA

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
ÜYE

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yetişmemde çok büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen değerli aileme minnettarım. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bana yardımcı olan başta danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Turan KARACA, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR, Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve Trakya Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Bölümünün tüm çalışanlarına katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmama mali destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
DİABETES MELLİTUS	3
DENEYSEL DİYABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN	4
DİYABET VE OKSİDATİF STRES.....	6
DİYABET VE TESTİS DOKUSU	8
FUKOİDAN.....	11
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	14
BULGULAR.....	19
TARTIŞMA	41
SONUÇLAR.....	46
ÖZET	48
SUMMARY	50
KAYNAKLAR.....	52
ŞEKİLLER LİSTESİ	60
ÖZGEÇMİŞ	62
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FSH	: Follicle-stimulating Hormone
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
H-E	: Hematoksilen-Eosin
LH	: Luteinizing Hormone
PAS-HI	: Periyodik Asit Schiff-Hemalen
PBS	: Phosphate Buffer Saline
ROS	: Reactive Oxygen Species
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM, diyabet), dünya nüfusunun ortalama % 8.3'ünü etkileyen önemli bir metabolizma hastalığıdır (1). Bu oran, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye'de %12'lere varmaktadır (2). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin verilerine göre; 2014 yılında 20-79 yaş aralığındaki, yaklaşık 5.1 milyon insan diyabet sebebiyle hayatını kaybetmiştir (2,3). Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı kapsamında hazırlanan eylem planına göre ve Dünya Sağlık Örgütü'nün raporu doğrultusunda, Türkiye'de 2000 yılında 2.920.000 olan diyabetik birey sayısının, %220'lik bir artış oranı ile 2030 yılında 6.422.000 olacağı ön görülmüştür (4).

Erkek infertilitesine sebep olan karaciğer ve koroner kalp hastalıkları, sigara kullanımı ve vitamin eksikliği gibi pek çok faktör arasında, diyabet hastalığı son zamanlarda gittikçe önem kazanmaktadır (5). Diyabetik erkeklerde; sperm sayısı ve hareketliliğinde azalma, seminal sıvı hacmi ve testosteron düzeylerinde düşüşün yanı sıra, özellikle testis dokusunda spermatogenez sürecinde izlenen histopatolojik değişimler, klinik ve deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur (6-9).

Normal bir spermatogenez sürecini etkileyen tüm bileşenler arasında, mükemmel bir koordinasyon gereklidir. Fakat diyabet gibi sistemik hastalıklar sebebiyle, hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde ortaya çıkan değişimler, spermatogenez sürecini olumsuz yönde etkilemektedir (10-13).

Diyabet patogenezinde rol oynayan oksidatif stresin, hiperglisemi sebebiyle ortaya çıktığı bilinmektedir. Deneysel diyabet modeli oluşturulan birçok çalışmada, hipergliseminin

serbest radikal oluşumunu arttırdığı ve oksidatif stresin ortaya çıkmasında etkili olduğu gösterilmiştir (1,8,14-16).

Diyabetik hastalarda ve deneklerde ortaya çıkan oksidatif stres, antioksidan savunma sistemlerinin bozulmasına veya yetersiz kalmasına sebep olabilmektedir (1,15). Diyabetik hastalarda artan oksidatif strese karşı, doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanların kullanımı, ortaya çıkan olumsuzlukların giderilmesine yönelik olarak sıklıkla araştırılmaktadır (9,16-18).

Çin tıbbında bin yılı aşkın bir süredir ilaç olarak kullanılan fukoidan, kahverengi deniz yosunlarından elde edilen sülfatlanmış bir polisakkarittir (19-22). Son yıllarda özellikle kanser araştırmalarında, bunun yanı sıra; antioksidan, anti-inflamatuvar, immünomodülatör ve kan-glukoz homeostazını düzenleyici etkileri sebebiyle de birçok çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır (20-23).

Bu çalışmada; güçlü antioksidan özelliği ve kan glukoz homeostazına etkisiyle dikkat çeken fukoidanın, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların testis dokularındaki histopatolojilere etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece yurtdışında tablet formunda bitkisel destek olarak piyasaya sunulan bu antioksidanın, diyabetik erkek infertilite tedavisine katkı sağlayabileceği kanaatindeyiz.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, pankreastaki beta (β) hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun yetersizliği veya etkisindeki defektler nedeniyle ortaya çıkan, kronik bir metabolizma hastalığıdır. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile birlikte kronik hiperglisemi, hastalığın önemli parametreleri arasındadır (2,4,11,24,25).

Diabetes Mellitus Sınıflandırması

Diyabet hastalığının sınıflandırılması ilk olarak 1979 yılında Diyabet Veri Grubu tarafından yapılmıştır (26). 2015 yılında yayınlanan Amerikan Diyabet Örgütü raporundaki güncel sınıflandırma (24) ise şöyledir;

Tip 1 diyabet: Diyabetin bu tipi, insülin bağımlı diyabet ya da juvenil başlangıçlı diyabet olarak da adlandırılmaktadır. Tüm diyabetik hastaların yaklaşık olarak %5-10'unu oluşturur. Pankreas β hücrelerinin, hücre aracılı oto-immün yıkımı sonucu ortaya çıkar (2,4,24,27,28). Pankreas β hücre yıkımı genellikle, bebeklerde ve çocuklarda hızlı, yetişkinlerde daha yavaş olmaktadır (24,25). Çocuklar ve gençlerde hastalığın ilk belirtisi genellikle ketoasidoz olabilir. Yetişkinler ise yıllarca ketoasidoza karşı β hücre fonksiyonlarını muhafaza edebilirler. Fakat nihayetinde bu bireyler, hayatta kalmak için insüline bağımlı hale gelip, ketoasidoz riski taşırlar. Glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD65), tirozin fosfataz bağlı adacık antijen 2 (IA-2 ve IA-2 β), çinko taşıyıcı 8 (ZnT8) otoantikörleri, Tip 1 diyabet tanısında önemli belirteçlerdir (24,29-31).

Tip 2 diyabet: Tip 2 diyabet; insülin bağımlı olmayan ya da yetişkin başlangıçlı diyabet olarak isimlendirilmektedir. Tüm diyabetik hastaların yaklaşık olarak %90-95'ini oluşturur. İnsülin sekresyonunda bozukluk, insülin direncinin bulunması veya her iki durumun birlikte ortaya çıkmasıyla karakterize diyabet tipidir (2,4,24,27). Tip 2 diyabetli hastalarda çoğunlukla insülin tedavisine ihtiyaç duyulmaz (3,24).

Tip 2 diyabette ketoasidoz, genellikle enfeksiyon gibi başka bir hastalığın stresine bağlı olarak ortaya çıkar. Bu tip diyabette, hiperglisemi yavaş yavaş gelişir. Genellikle hastalar, uzun yıllar tanı konulmadan hayatlarına devam ederler. Bununla birlikte makro ve mikrovasküler komplikasyonlar gibi risk faktörlerine maruzdurlar. Bu hastaların, insülin seviyeleri genellikle normal veya normalden biraz fazladır. Fakat yağ, kas ve karaciğer gibi dokularında insülinin etkilerine karşı gelişen direnç, normal veya daha fazla seviyede üretilen insülin hormonunun efektif bir şekilde kullanılamamasına neden olur (2,4,24).

Gestasyonel diyabet: İlk kez gebelik sırasında ortaya çıkan ve glukoz intoleransı olarak tanımlanan diyabet tipidir. Toplumlara göre görülme oranı değişmekle birlikte, insidansı % 1 ile % 14 arasındadır (2,4,24,32).

Annenin yaşı, gestasyonel diyabet görülme sıklığını etkileyen önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalar, 25 yaş ve üstü anne adaylarının, gestasyonel diyabet açısından daha fazla risk taşıdığını göstermiştir. Ayrıca, ailede diyabet öyküsü bulunması, obezite ve önceki gebeliklerde gestasyonel diyabet tanısı almış olmakta önemli risk faktörlerindedir (4,24,32,33).

Genellikle tarama testleri, hamilelikte diyabetojenik etkilerin ortaya çıktığı 24-28. haftalar arasında yapılmaktadır (24,32,34).

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri: Bu diyabet tipleri; çeşitli genetik defektler, enfeksiyonlar, patolojiler, kimyasal ajanlar ve ilaçlara maruziyet sonucu ortaya çıkmaktadır. Diyabetik hastaların yaklaşık olarak %1'lik bir kısmını oluşturur (3,4,24).

DENEYSEL DİYABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN

Hayvan deneyleri, diyabet araştırma alanında uzun bir tarihe sahiptir. 1800'lü yıllarda hiperglisemi oluşum mekanizmaları araştırılırken Minkowski tarafından köpektan pankreasın çıkarılması fikri ortaya atılmıştır. Köpektan pankreasın çıkarılmasını takiben deneklerde diyabetin önemli semptomları olan polidipsi ve poliüri oluşumu gözlemlenmiştir. 1920

yılında Marjorie'nin köpek pankreas dokusundan insülini izole etmesiyle birlikte, diyabet çalışmalarında yeni bir dönem başlamıştır. Banting ve Best ise ilk olarak 1921'de pankreasın Langerhans adacıklarından insülin salgılandığını ileri sürmüşlerdir (35,36).

Pankreas-insülin ilişkisinin ortaya konulmasından sonra, deneysel diyabet çalışmalarında, pankreasın Langerhans adacıklarında bulunan β hücrelerine karşı spesifik toksinlerin kullanılması gündeme gelmiştir (35,37,38).

Bu çalışmaların ışığında, günümüze kadar yapılan araştırmalarda kullanılan deneysel diyabet modelleri;

- ❖ Kimyasal diyabet modelleri,
- ❖ Spontan diyabet modelleri,
- ❖ Virüs ile oluşturulan modeller,
- ❖ Transgenik modeller,
- ❖ Diğer modeller;
 - Cerrahi modeller (pankreatektomi, hipotalamik lezyonlar vb.),
 - Diyet (yüksek yağlı ve şekerli beslenme),
 - Anne karnında malnutrisyon,
 - İnsülin karşıtı hormonların yüksek dozları,
 - Hiperinsülinemiye uzun süreli maruziyet vb.

gibi başlıklar altında toplanmaktadır (35,37-40).

β hücrelerine karşı spesifik bir kimyasal ajan olan Streptozotosin (STZ, 2 - deoksi - 2 - (3 - metil - ditrozoüreido) - D - glukopiranoz), deneysel çalışmalarda hem tip 1 diyabet hem de tip 2 diyabet indüksiyonu için kullanılmaktadır (39,41). *Streptomyces achromogenes*'den elde edilen bu kimyasal ajanın, diyabetojenik etkilerinin yanı sıra; antitümoral, antibiyotik ve karsinojenik etkileri de bulunmaktadır. STZ; yapısında içerdiği glukoz molekülü sebebiyle, pankreas β hücrelerinde bulunan glukoreseptörlere (GLUT2) kolaylıkla bağlanarak hücre içerisine alınır ve glukoz ile uyarılan insülin salınmasını bloke eder. β hücrelerine alınan STZ'nin ilk etkisini, hücrenin glukozla olan yanıtını ortadan kaldırarak gösterdiği düşünülmektedir. Bu olayı takiben kalıcı hücre hasarı ve sonrasında kaybı oluşmaktadır (35,39,40).

Streptozotosin asıl etkisini, pankreas β hücrelerindeki deoksiribonükleik asit (DNA)'i hedef olarak gösterir. STZ maruziyeti ile hücre içerisindeki nitrozüre grupları dekompozisyona uğrar ve sonuç olarak; oluşan reaktif karbonyum iyonları, DNA bazlarında alkilasyona neden olur. Alkilasyon sonrasında DNA tamir mekanizması devreye girer ve tamir sırasında görev alan poli ADP riboz polimeraz (PARP)'ın hücre içerisindeki nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺)'ni kullanması nedeniyle NAD depoları boşalarak ATP içeriği azalır. Böylece enerji depolarının tüketimi β hücrelerinde nekroza yol açar (35,39,41).

Streptozotosin uygulamasını takiben üç fazlı biyokimyasal bir değişim süreci başlar (35,39).

- 1. Geçici hiperglisemi fazı:** STZ enjeksiyonundan sonra başlayan ve yaklaşık olarak 2-4 saat süren, insülin sekresyonunun durması ve karaciğer glikojeninin ani yıkımından dolayı ortaya çıkan fazdır.
- 2. Hipoglisemik faz:** STZ enjeksiyonundan 4-8 saat sonra görülmeye başlayan β hücre nekrozu sonucu, kana aşırı insülinin salındığı faz olarak bilinmektedir. STZ uygulamasını takip eden ilk 24 saatlik süreçte meydana gelen denek kayıpları genellikle bu fazda görülmektedir.
- 3. Kalıcı hiperglisemi fazı:** Enjeksiyondan sonraki 12-48. saatlerde oluşan ve kalıcı hipergliseminin olduğu fazdır. β hücre nekrozu sonucu kandaki düzeyi fazla olan insülinin kullanılmasından sonra, insülin düzeyleri düşer ve hiperglisemi tablosu ortaya çıkar. Bu fazın devamlılığının sağlanması, hayvanlarda diyabet semptomlarının ortaya çıkmasında etkilidir.

DİYABET VE OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller, atomik ya da moleküler yörüngesinde oldukça reaktif olan ortaklanmamış elektron içeren kimyasal ürünlerdir (42-45). En fazla miktarda elektron taşıma sistemlerinde ortaya çıkarlar. Serbest radikal reaksiyonları, nötrofil ve makrofaj gibi vücudun savunma sistemi hücreleri için gerekli olsa da, bu radikallerin fazla miktarda üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Serbest radikallerin meydana getirdiği reaktif oksijen türleri (ROS); hücrelerin DNA, protein, karbonhidrat ve lipid gibi bileşenlerine etki ederek bu yapılarda bozulmalara yol açmaktadır (6,7,42,43,46).

Oksijen, insan yaşamı için son derece önemli olmasına rağmen, metabolizma sürecinde üretilen bazı ROS'lar, organizmaya zarar verme potansiyelindedir. Büyük bir kısmını serbest radikallerin oluşturduğu ROS'lar normal oksijen molekülü ile karşılaştırıldıklarında oldukça reaktif yapılardır (47).

ROS oluşumunu ve bunlara bağlı olarak ortaya çıkan hasarları önlemek için vücutta antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Antioksidanlar, hem endojen hem de ekzojen kaynaklı olabilmektedirler ve oksidan moleküllerin hasarlarından organizmayı korumakla görevlidirler. Asıl antioksidan savunma sistemini, hücre içi enzimler meydana getirmektedir. Bu enzimlerden bazıları katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutazdır (SOD) (43,47-49).

ROS üretimi ve antioksidan savunma molekülleri arasındaki denge sağlandığı sürece, organizma serbest radikallerin olumsuz etkileri ile karşı karşıya kalmamaktadır. Fakat serbest radikallerin artışı veya bunların ortadan kaldırılmasına yetecek antioksidan moleküllerin üretilmemesi sonucu, bu dengenin ROS lehine bozulması, doku hasarına yol açmaktadır. Bu dengesizlik durumuna oksidatif stres adı verilmektedir (43,45,50). Organizmalardaki; nitrik oksit (NO·), peroksil radikali (ROO·), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (HO·) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stres durumunun ortaya çıkmasında etkilidir (43,47).

Oksidatif stres; kalp hastalıkları, yaşlanma, kanser, diyabet ve diyabet komplikasyonları başta olmak üzere çok çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasında önemli bir etmendir (43,46,50,51). Diyabette ortaya çıkan oksidatif stres, tam olarak aydınlatılmamış pek çok mekanizmaya bağlı olarak artmakla birlikte, yapılan çalışmalarda diyabetik hastalar ve deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda; artmış oksidatif stresin, aşırı ROS üretimi ve antioksidan sistemlerdeki bozulmanın sonucu olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (52-54).

Diyabet ile birlikte ortaya çıkan hiperglisemi, oksidatif stresi arttıran bir faktördür. Oksidatif stres artışına bağlı olarak diyabetik hastaların antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı vurgulanmaktadır (7,43,47).

Diyabetik olguların; eritrosit membran lipidlerinde, plazma lipoproteinlerinde ve çeşitli dokularında lipid peroksidasyonunun arttığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Lipid peroksidasyonunun yanı sıra diyabetik olgularda artmış protein oksidasyonu da göze

çarpmaktadır. Özellikle elastin, kollajen ve miyelin kılıf etrafında bulunan ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucunda; nefropati, retinopati, mikroanjyopati ve ateroskleroz gibi diyabetik komplikasyonların geliştiği bilinmektedir (43,55,56).

Diyabet ile birlikte oksidatif stres ve germ hücre apoptozisinin gözlemlendiği; sıçan testiküler dokularında önemli ölçüde SOD ve GPx enzim aktivitelerinde azalmanın yanı sıra, lipid peroksidasyonu sonucu son ürün olarak açığa çıkan malondialdehit (MDA) aktivitesinde de bir artışın olduğu vurgulanmıştır (6,57).

DIYABET VE TESTİS DOKUSU

Ekzokrin ve endokrin fonksiyonları bilinen testis dokusu, *funiculus spermaticus*'a bağlı olarak kıvrımlı deri kesesi '*scrotum*' içerisinde çift halde bulunmaktadır. *Scrotum*'un iç yüzü *septum scroti* ile iki ayrı bölmeye ayrılır ve testisler bu bölmelerde yer almaktadırlar. Her bir testis yetişkin erkeklerde yaklaşık olarak 10-14 gram ağırlığa, 4-5 cm uzunluğa ve 2,5 cm enine sahiptir (58,59).

Epiblasttan köken alan primordial germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederler ve 3. haftada vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşirler. 4. haftada son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek gonadal kabartılara göç ederler ve 6. haftada gonadal kordonlara katılırlar. Gelişimin 7. haftasında, XY kromozomuna sahip embriyoda primordial germ hücreleri, Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktörü (TDF) kodlayan seks belirleyici bölge Y (SRY) geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalmaya devam ederler (60,61).

Testisler, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile sarılmışlardır. Bu kapsülün en dış tabakası tunica vajinalis, orta tabakası tunica albuginea ve en iç tabakası tunica vasküloza ismini alır. Tunica vajinalis, testislerin scrotum'a inerken sürüklediği abdominal peritonun bir uzantısıdır. Testisin anterolateral yüzeyini kaplayan bu tabaka, mezotel ile döşelidir. Tunica albuginea, testisin en kalın tabakasıdır. Fibroelastik bir bağ doku yapısına sahiptir ve testisin arka yüzünde kalınlaşarak 'mediastinum testis' adı verilen yapıyı oluşturur. Testislere giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve spermin geçtiği kanallar, mediastinum testis içerisinde seyreder. Kapsülün en iç tabakasını oluşturan tunica vasküloza ise kan damarları açısından zengin, gevşek bağ dokusu yapısındadır. Kapsülden testis içerisine uzanan ince bağ dokusu uzantıları testisi sayıları 200-300 civarında değişen lobüllere ayırır. Bu lobüllerin her

biri, içerisinde sperm üretiminin yapıldığı yüksek düzeyde kıvrımlı, 1-4 adet tubulus seminiferous contortus (seminifer tübül)'tan ve tübüllerin etrafını döşeyen; kan damarlarını, sinirleri ve interstisyel (Leydig) hücreleri içeren gevşek bağ dokusundan oluşur (62-64).

İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri; eosinofilik, büyük ve poligonal hücrelerdir. Bu hücreler steroid yapılı olan testosteron hormonu salgırlar. Testosteron; embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma, sperm üretiminin başlatılması ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludurlar (62,63).

Her bir seminifer tübül, 30-50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapında olup bazal membran üzerine yerleşmiş çok katlı epitel olan seminifer (germinal) epitelden oluşmaktadır. Seminifer epitel, temel olarak Sertoli (sustentakuler) hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinden meydana gelmektedir. Sertoli hücreleri, gelişmekte olan sperm hücrelerini koruyan, besleyen ve destekleyen hücrelerdir. Puberte sonrası bölünme yetenekleri bulunmayan bu hücreler; belirgin nükleolus içeren üçgen veya yuvarlak şekilli ökromatik bir nükleusa sahiptirler. İyi gelişmiş granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum, belirgin Golgi kompleksi, bol mitokondri, lizozom, glikojen granülleri ve lipid damlacıkları bulundururlar (62).

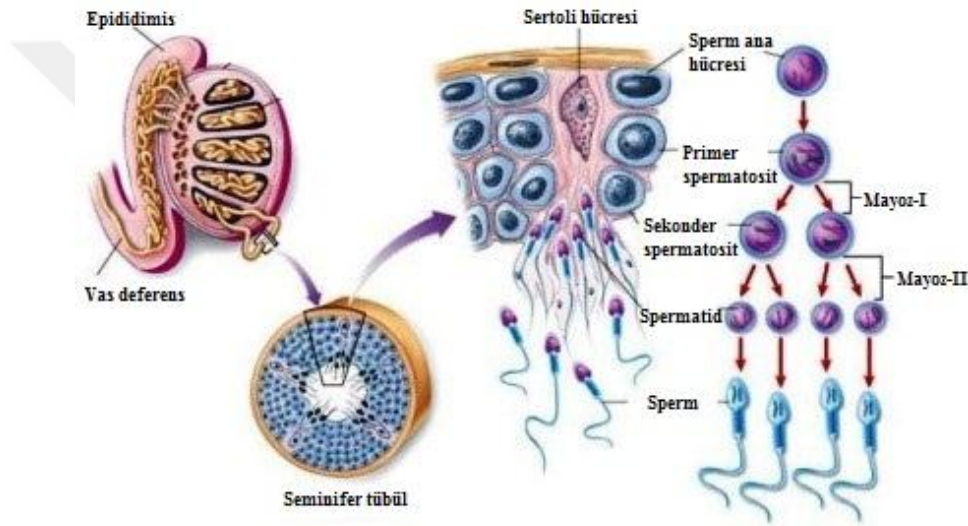
Olgun sperm üretim aşamalarını kapsayan spermatogenez, seminifer tübüllerde meydana gelen bir süreçtir (Şekil 1). Spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı olmak üzere üç aşamada meydana gelmektedir (63).

Spermatogonyal fazda; sperm ana hücreleri olan spermatogonyumlar, mitoz bölünme geçirerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve primer spermatositleri meydana getirirler. İnsan spermatogonyumları, nükleus görünüşleri dikkate alınarak üç tip olarak sınıflandırılmıştır. Tip A koyu spermatogonyumlar, seminifer epitelin kök hücreleri olarak görev yaparlar. Mitoz bölünmeleri sonucunda ya kök hücre olarak kalırlar ya da Tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, bir dizi mitoz bölünme geçirerek Tip B spermatogonyumları meydana getirirler. Tip B spermatogonyumlar da, mitoz bölünme geçirerek primer spermatositleri meydana getirirler (62,63).

Spermatosit fazında; Tip B spermatogonyumların meydana getirdiği primer spermatositler, mayoz bölünme geçirmeden hemen önce DNA'larını replike ederler. Bu yüzden her primer spermatosit '2n' kromozom ve '4d' DNA içerir. Mayoz I aşamasında, kromozom sayısı ve DNA miktarı yarıya iner. Mayoz I sonucunda 'n' kromozomlu ve '2d'

DNA içeren sekonder spermatozoidler meydana gelir. Bu hücreler yeniden DNA sentezlemeden mayoz II'ye geçerler. Bu bölünme tamamlandığında 'n' kromozomlu ve 'd' DNA içeren spermatidler oluşur (63).

Spermatid fazında; haploid spermatidler, olgun sperm meydana getirmek üzere spermiyogenez ismi verilen farklılaşma sürecine girerler. Farklılaşma süreci; akrozom oluşması, nükleer yoğunlaşma, kuyruk gelişimi, Sertoli hücrelerinin sitoplazmanın artan parçalarını fagosite etmesi ve olgun sperm meydana gelmesiyle sonuçlanır (62,63).



Şekil 1. Spermatogenez (65)

Diyabetik erkeklerde ve deneysel diyabet oluşturulmuş hayvan modellerinde yapılan çalışmaların sonucunda; spermatogenez disfonksiyonu, testiste dejeneratif ve apoptotik değişiklikler, azalmış testosteron sentezi ve salgılanması, erektil ve ejakülasyon disfonksiyonu, düşük libido ve kan-testis bariyerinde meydana gelen değişiklikler ile DM'nin infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (6,11,12,66-68). DM, ayrıca hipotalamus-hipofiz-gonad eksenine etki ederek folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH)'ların salınmasındaki kontrol mekanizmalarını da değiştirmektedir (11-13).

Diyabetik sıçanlarda; spermatogonyum ve spermatozoidlerde yoğunlaşmış nükleer kromatin, sperm DNA'sında fragmantasyonlar, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyonlar ve Leydig hücrelerinde biriken lipid damlacıklarının yanı sıra seminifer epitel kalınlığında,

testisin toplam alanında ve serum testosteron düzeylerinde önemli ölçüde azalmanın olduğu belirtilmiştir (11,69-72). Ayrıca testis dokusunda; spermatogenez bozukluğu, germ hücre kaybı, interstisyel dokuda ödem, germinal epitel kalınlığında ve seminifer tübül çaplarında azalma, ayrıca ultrastrüktürel olarak da Sertoli hücrelerinde serbest endoplazmik retikulum organellerinde bir azalmanın meydana geldiği çalışmalarda gösterilmiştir (11,70,71,73).

FUKOİDAN

Fukoidan, kahverengi deniz yosunları ve bazı deniz omurgasızlarında bulunan, önemli ölçüde L-fukoz ve sülfat ester gruplarını içeren bir polisakkarittir. Bu polisakkarit ilk olarak 1913 yılında Kylin tarafından kahverengi deniz yosunlarından elde edildiğinde 'fukoidin' olarak isimlendirilmiştir (74,75). Daha sonrasında, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) kurallarına göre "fukoidan" olarak isimlendirilmesine karar verilmiştir (75).

Son yıllarda farklı türlerden elde edilen fukoidanlar; antioksidan (76), antikoagulan (76), antitrombotik, antiviral (77), antitümör (20), immünmodülatör (21), anti-inflamatuvar (22) ve kan glukoz homeostazını düzenleyici etki (23) gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteleri, yaygın olarak bulunabilmesi ve ucuz olması sebebiyle, diğer sülfatlanmış polisakkaritlere nazaran, araştırmalarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (75).

Temel olarak fukoidan olarak adlandırılan moleküler yapılar, birbirlerine benzerlik göstermelerine rağmen, elde edilen türe göre de büyük farklılıklar içerebilmektedir. Örneğin; *Cladosiphon okamuranus*'tan elde edilen fukoidanın, meme kanseri modelinde plateletlerin adezyonunu inhibe etmediği, fakat *Fucus vesiculosus*'tan elde edilen fukoidanın %80 oranında bu inhibisyonu gerçekleştirdiği belirtilmiştir (78).

Toksikoloji raporlarında, *Laminaria japonica* ve *Undaria pinnatifida* türlerinden elde edilen fukoidanların, fazla miktarlarda tüketilmesinin hayvan modellerinde güvenilir olduğu bildirilmiştir (79,80). İnsanlar üzerinde yapılan sınırlı sayıdaki klinik araştırmalarda ise oral yoldan alınan *Fucus vesiculosus* (%85) ve diğer 2 türden elde edilen fukoidan preparatlarının 3 ay boyunca her gün 1 gr. (81) veya *Undaria pinnatifida* türünden elde edilen preparatı 12 gün boyunca her gün 3 gr. (82) alan kişilerde herhangi bir toksisiteye rastlanmamıştır.

Kimyasal İçeriği

Kylin'in fukoidanı izole etmesinden bu yana, farklı türlerde kahverengi yosunlardan elde edilen fukoidanların kimyasal yapıları incelenmiştir. Basit kimyasal yapı olarak fukoz ve sülfat gruplarından oluşan fukoidanların, kimyasal içerikleri oldukça karmaşıktır. Fukoz ve

sülfatın yanı sıra monosakkaritler (mannoz, galaktoz, glukoz, ksiloz vb.), üronik asitler, asetil grupları ve proteinler de fukoidanların kimyasal yapısında bulunan maddelerdir. Ancak fukoidan elde edildiği türe göre farklı kimyasal kompozisyona ve içeriğe sahip olmaktadır (75,83).

Avustralya biyoteknoloji şirketi Marinova Pure Source-Pure Science (Marinova Pty Ltd.) tarafından standardize edilmiş metodlar kullanılarak tanımlanan çeşitli türlerdeki fukoidan içerikleri Tablo.1’de sunulmuştur (78).

Tablo 1. Çeşitli türlerde bulunan fukoidan içerikleri

Tür	Fukoz (%)	Sülfat (%)	Ksiloz (%)	Galaktoz (%)	Üronik Asit (%)	Katyonlar (%)	Diğer (%)
<i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma Crude)	45.9	32.0	3.3	4.3	7.0	7.6	0.92
<i>Laminaria japonica</i>	34.1	31.7	1.0	4.2	14.4	13.2	2.3
<i>Undaria pinnatifida</i>	32.6	29.6	0.0	25.2	4.0	7.7	1.75
<i>Macrocystis pyrifera</i>	30.5	32.4	2.2	5.6	12.4	15.1	2.8
<i>Ecklonia radiata</i>	19.0	19.1	11.0	12.0	25.5	5.4	8.35

Kan-Glukoz Homeostazı, Antioksidan ve Anti-inflamatuvar Etkisi

Diyabetik fareler üzerinde yapılan çalışmada; ham fukoidanın, kan-glukoz seviyelerine önemli ölçüde etki ettiğinin ve özellikle *Undaria pinnatifida*’dan elde edilen sülfatlı fukoidanın, diyabetin komplikasyonlarında potansiyel bir madde olarak kullanılabileceği ileri sürmüştür (23). *Saccharina japonica*’dan elde edilen fukoidanın diyabetik sıçanlarda kan glukoz düzeylerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, Wang ve ark. (19) tarafından 8 hafta boyunca 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında fukoidan uygulanmış ve sadece 300 mg/kg fukoidan verilen grupta kan glukoz seviyelerinde önemli ölçüde düşüş gözlemlenmiştir.

In vitro ve *in vivo* çalışmalar sonucunda, fukoidanın güçlü bir antioksidan olduğu ve serbest radikal aracılı hastalıkların önlenmesinde büyük bir potansiyele sahip olduğu saptanmıştır. *Laminaria japonica*’dan elde edilen fukoidanın, diyabetik farelerin dalak ve karaciğer dokularında lipid peroksidaz aktivitesini önlediği ileri sürülmüştür (75).

Fukoidanın antioksidan aktivitesi; sülfat içeriği ve moleküler ağırlığına bağlıdır. Çeşitli türlerden elde edilen fukoidanların moleküler ağırlıkları Tablo.2’de gösterilmiştir (78) (Marinova Pty. Ltd. tarafından standardize edilen veriler).

Tablo 2. Çeşitli türlerde bulunan fukoidanın moleküler ağırlıkları

Tür	Moleküler ağırlık (kDa)
<i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma crude)	20.7
<i>Laminaria japonica</i>	395.4
<i>Undaria pinnatifida</i>	51.7
<i>Macrocystis pyrifera</i>	176.4
<i>Ecklonia radiata</i>	528.2

Biyolojik sistemlerde üretilen ROS’lardaki artış, birçok hastalığın moleküler temelini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda kahverengi deniz yosunlarından elde edilen polisakkaritlerin, potansiyel ROS süpürücü olduğu vurgulanmıştır (84).

Fucus vesiculosus’tan elde edilen fukoidanın, hidroksil ve süperoksit radikalleri oluşumunu inhibe edici bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (75,85).

İnflamatuvar yanıt, çok sayıda lökositin (nötrofil, monosit, makrofaj, mast hücreleri) iltihaplı bölgeye infiltre olması ile karakterizedir. Bu inflamatuvar hücreler, inflamasyon araçları tarafından tetiklenirler ve süperoksit, nitrik oksit gibi radikalleri meydana getirirler. Bu sebeple, antioksidan ve anti-inflamatuvar aktiviteler birbirleri ile yakın ilişki halindedirler (86).

Kan glukoz homeostazına etkisi, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra fukoidanların; antitümoral ve immünmodülatör etkileri de bilinmektedir. Melonoma B16 ve Lewis akciğer karsinoma hücreleri üzerine ham fukoidanın etkilerinin incelendiği çalışmada, melonoma hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Aynı zamanda ham fukoidan ekstraktının, hem akciğer hem de deri kanseri modellerinde, doğal hücre öldürücülerin (NK cell) aktivitesini de arttırdığı ileri sürülmüştür (87).

İmmün sistemi baskılanmış farelerde fukoidan tedavisinin, immün sistem üzerine düzenleyici bir rolü olduğu, makrofaj ve T lenfositler üzerine de direkt olarak immünmodülatör etki yarattığı gösterilmiştir (75).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunuldu ve 2014.02.03 no'lu karar ile onay alındı (Ek 1). Etik kurul onayının ardından Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) maddi destek için başvuruldu ve 114S153 no'lu projenin bir bölümü olarak desteklenmesine karar verildi.

Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden, 3 aylık, ağırlıkları 260–340 gr arasında değişen 24 adet *Wistar albino* erkek sıçan temin edildi. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip olan deneklerimiz deney süresince stabil laboratuvar koşulları altında (22 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutuldu. Günlük içme suyu ile birlikte ham %21 protein içeren pelet yemlerle (Purina, Bursa, Türkiye) beslendi.

Deneklerimizden;

1. Grup: Kontrol grubu; sadece sitrat tamponu (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık) + %0.9'luk serum fizyolojik intraperitoneal (ip.) verilen grup (n=6).
2. Grup: Diyabet grubu; 40 mg/kg STZ 5 ardışık gün ip. (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda çözülerek) verilen grup (n=6).
3. Grup: 40 mg/kg STZ, 5 ardışık gün ip. + 50 mg/kg ip. fukoidan (%0.9'luk serum fizyolojik içerisinde çözülerek, son STZ enjeksiyonundan sonra 6 hafta boyunca, iki günde bir) verilen grup (n=6).

4. Grup: 40 mg/kg STZ, 5 ardışık gün ip. + 50 mg/kg ip. fukoidan (%0.9'luk serum fizyolojik içerisinde çözülerek, diyabet oluşturulduktan 15 gün sonra, 6 hafta süresince, iki günde bir) verilen grup (n=6)'lar oluşturuldu.

Diyabet oluşturmak için kullandığımız STZ (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya)'nin iyi çözüldüğü ve stabilitesini koruduğu bir solüsyon olan sitrat tamponu, steril enjeksiyonluk suyla hazırlandı ve pH'ı 4.2'ye ayarlandı. STZ, sitrat tamponunda çözüldükten hemen sonra deneklere uygulandı.

Deneklerin vücut ağırlıkları, deneyin başlangıcından sonuna kadar her hafta ölçüldü. Kuyruk veninden alınan kan örneklerindeki, kan glukoz düzeylerine; deneyin başlangıcında, STZ verilmesini takiben 48 saat sonra ve deney sonuna kadar her hafta glukometre (IME-DC, Hof, Almanya) ile bakıldı. STZ uygulandıktan 48 saat sonra, kan glukoz değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler "diyabetik" kabul edildi.

Tüm deneklerin, planlanan deney süresinin sonunda, ketasol (Richterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, sağ ve sol testis dokuları total olarak çıkarıldı, ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal çalışmalar için işlemlendirildi.

İŞIK MİKROSKOBİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Işık mikroskopik rutin boyamalar ve immünohistokimyasal incelemeler, Trakya Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Rutin Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu incelemeler için; testis doku örnekleri, %10'luk formaldehitte (Sigma Aldrich) fikse edildikten sonra, dokular yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dehidratasyon aşamasından sonra, saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile muamele edildi, önce yumuşak parafin (Merck Millipore) ve sonrasında sert parafine (Merck Millipore) alınarak, parafin bloklar elde edildi. Dokulardan histolojik ve morfometrik analizler için mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak Hematoksilen-Eosin (H-E), Periyodik asit Schiff-Hemalen (PAS-HI) boya ve apoptozisi belirlemek amacıyla terminal deoksiniükleotidil transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu uygulandı.

Hematoksilen-Eosin Boyası

Beş µm kalınlığındaki kesitler, parafinin giderilmesi için 30 dk boyunca toluol ile muamele edildi. Parafinden uzaklaştırılan kesitler sırasıyla %100, %96, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek, suya indirildi. Kesitler 10 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (Merck Millipore) boyası ile muamele edildi. Daha sonra morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dakika bekletilen kesitlere, 1 dk. Eosin (Merck Millipore) boyası uygulandı. Dehidratasyon için; sırasıyla yükselen derecelerdeki alkol serilerinden geçirildikten sonra, kesitler toluol ile muamele edildi ve entellan (Merck Millipore) ile daimi preparat haline getirildiler.

Periyodik Asit Shiff-Hemalen Boyası

Uygun kalınlıkta alınan kesitler, H-E boyamasında olduğu gibi öncelikle suya indirildi. Daha sonra 5 dk %1'lik periyodik asit (Merck Millipore) solüsyonu içerisinde bekleyen kesitler, bu süre sonunda 30 dk boyunca shiff solüsyonu ile muamele edildi. Shiff solüsyonun ardından, 3 kez 5 dk. yıkama solüsyonlarından geçirilen kesitler, yükselen alkol serileri ve toluolden geçirilerek, entellan ile kapatıldılar.

Johnsen Skorlaması

Johnsen skorlaması; testis doku örnekleri için 1970 yılından beri kullanılan ve günümüzde de geçerliliğini koruyan bir yöntemdir. Bu yöntem spermatogenezi kategorize etmek için kullanılmaktadır (88).

Tablo 3. Johnsen skorlaması

Skor 1	Seminifer tübüllerde hücre yok.
Skor 2	Spermatogenik hücreler yok, yalnızca Sertoli hücreleri var.
Skor 3	Sadece spermatogonyumlar var.
Skor 4	Spermatid yok, sadece birkaç tane spermatosit var
Skor 5	Spermatid yok; ancak spermatositler var.
Skor 6	Sperm yok, az spermatid mevcut.
Skor 7	Bol spermatid mevcut; ancak sperm yok.
Skor 8	Germinal epitel çok sıralı; ancak lümende 10'dan az sayıda sperm var.
Skor 9	Germinal epitelde çok sıralı; ancak düzgün olmayan görünüm mevcut, lümende obliterasyona yol açan hücre dökülmesi var.
Skor 10	Çok sıralı, bol spermatozoa ve santralde açık lümen içeren tübüller var.

Bu çalışmada Johnsen skorlaması; her bir deneğe ait H-E boyaması uygulanan preparatlarda, 10 farklı sahada, rastgele seçilmiş 10 farklı semifer tübülde gerçekleştirildi. Değerlendirme kriterleri Tablo 3’de belirtilmiştir (88,89). Bu inceleme için; Olympus BX51 marka mikroskobun, x400’lük büyütmesi kullanıldı.

TUNEL PROSEDÜRÜ

Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla 5 µm kalınlığında alınan kesitler, bir gece 37°C’lik etüvde bekletildi ve ardından oda ısısında 5 dk soğumaya bırakıldı. Deparafinizasyon işlemi için toluolden ve dehidratasyon işlemi için alkol serilerinden geçirilen kesitler, daha sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH: 7.4, İnvitrogen, Kaliforniya, ABD) ile yıkandı. Proteinlerin sindirilmesi için, 15 dk oda ısısında proteinaz K solüsyonu (Merck Millipore) ile muamele edilen kesitler, distile sudan geçirildi. Bundan sonraki aşamalar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon SA. Merck Millipore) kullanılarak gerçekleştirildi. Endojen peroksidazın bloke edilmesi için kesitler 5 dk, %3’lük H₂O₂’e alındı. Daha sonra kesitler dengeleme tamponu ile oda ısısında 30 dk bekletildi ve ardından terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt) enzim solüsyonu ile 37°C’de inkübe edildiler. 10 dk durdurma/yıkama tamponu yapıldıktan sonra, oda ısısında 30 dk anti-digoxigenin peroksidaz ile muamele edilen kesitler, 3,3’-diaminobenzidine (DAB) ile kromojenize edildikten sonra, hematoksilin zıt boyaması yapıldı. Son olarak kesitler, alkol ve toluol serilerinden geçirilerek kapatıldı.

HÜCRE SAYIMI, BAZAL MEMBRAN KALINLIKLARI VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm grupların H-E, PAS-HI ve TUNEL boyaları uygulanan preparatları, Olympus BX-51 mikroskobunda incelenerek, farklı büyütmelede fotoğrafları çekildi.

Hazırladığımız H-E boyası uygulanmış preparatların kullanımıyla, tüm deneklerin testis doku örneklerinde semifer tübül çaplarının ölçümü; X200’lük büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak, yuvarlak veya yuvarlağa yakın, rastgele seçilen, her preparatta 10 tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirildi (90).

Periyodik asit shiff-hemalen boyası uygulanan testis kesitleri kullanılarak; bazal membran kalınlıkları ölçüldü. Her gruptan 6 farklı preparat ve her preparattan 5 farklı alanda yapılan ölçümlerin ortalamaları alındı (Argenit Kameram 2.11.5.1, İstanbul).

TUNEL tekniği uygulanan her bir testis kesitinde yer alan, ortalama 100 seminifer tübülde; en az 3 ve daha fazla apoptotik hücre bulunduran seminifer tübüller sayılarak ‘‘apoptotik tübül indeksi’’ ve seminifer tübüllerde yer alan ortalama 1000 hücredeki apoptotik hücreler sayılarak da ‘‘apoptotik hücre indeksi’’ hesaplandı (91).

İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı’nda SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanıldı, değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak alındı. $P < 0.05$ değer anlamlı kabul edildi. Mann-Whitney U testi ile; 1., 2., 3. ve 4. grup deneklerin kan-glukoz düzeylerinde, vücut ağırlıklarında, testis ağırlıklarında, testis boyutlarında ve bazal membran kalınlıklarında gruplar arasında farklılık olup olmadığı araştırıldı. Tüm deney gruplarındaki deneklere ait Johnsen skorlaması, seminifer tübül çapı ölçümleri, apoptotik seminifer tübül ve apoptotik hücre indeksleri, Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirildi.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ, VÜCUT VE TESTİS AĞIRLIKLARI

Deneklerin kan glukoz düzeyleri; deney başlamadan önce, diyabet oluşturduktan 2 gün sonra ve deney süresince her hafta ölçülmüştür. Deney başlamadan önce ölçülen kan glukoz düzeyi değerlerinde, tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 4). Deney sonunda ölçülen kan glukoz düzeyleri; sadece diyabet indüksiyonu yapılan 2. grup, diyabet indüksiyonundan hemen sonra fukoidan uygulanmaya başlanan 3. grup ve diyabet indüksiyonundan 15 gün sonra fukoidan uygulanmaya başlanan 4. grupta, kontrol grubu olan 1. gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$; Tablo 4). STZ uygulanan tüm gruplarda kan glukoz düzeyleri, deney süresince diyabetin devam ettiğini gösterir şekilde, 250 mg/dl'nin üzerinde tespit edilmiştir. Diyabet oluşturulduktan sonra fukoidanın farklı zamanlarda uygulandığı 3. ve 4. grupların değerleri, 2. grup ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $P=0.926$, $P=0.449$).

Tüm deney gruplarında yer alan deneklerin vücut ağırlıkları, deney başlamadan önce ve deney sonunda ölçülmüş, ortalama değerler Tablo 4'te sunulmuştur. Deney başlangıcında vücut ağırlık ortalamaları birbirine yakın bulunmasına rağmen, deney sonu ölçümlerinde 1. gruba göre diğer tüm gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($P<0.05$; Tablo 4).

Sakrifikasyondan sonra elde edilen sağ ve sol testis ağırlıklarının; 2. ve 4. gruplarda, 1. grubuna göre istatistiksel bir anlamlılıkla azaldığı tespit edilirken (sırasıyla sağ testis $P=0.009$, $P=0.009$; sol testis $P=0.009$, $P=0.016$), 3. grupta kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır (sağ testis $P=0.100$, sol testis $P=0.100$; Tablo 4).

Tablo 4. Kan glukoz düzeyi, vücut ve testis ağırlık değerleri

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup
Kan glukoz düzeyi Başlangıç (mg/dl)	100.80 ± 4.43	101.40 ± 6.04	98.50 ± 3.14	99.40 ± 7.95
Kan glukoz düzeyi Deney sonu (mg/dl)	108.75 ± 8.34	563.40 ± 37.78*	541.00 ± 81.98*	558.40 ± 78.31*
Başlangıç vücut ağırlık (g)	307.40 ± 14.99	318.60 ± 7.70	286.16 ± 6.58	306.00 ± 3.16
Deney sonu vücut ağırlık (g)	313.20 ± 6.05	221.2 ± 38.51*	204.00 ± 30.10*	224.60 ± 9.81*
Sağ testis ağırlık (g)	1.34 ± 0.05	1.06 ± 0.22*	1.24 ± 0.12	1.09 ± 0.15*
Sol testis ağırlık (g)	1.33 ± 0.03	1.02± 0.22*	1.22 ± 0.12	1.09± 0.16*

*: 1. grup ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

MORFOMETRİK BULGULAR

Sakrifikasyondan sonra ölçülen testis uzunluk ve genişlikleri kıyaslandığında; testis uzunluklarının 2., 3. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (P=0.014, P=0.007, P=0.007; Tablo 5). Testis genişlikleri karşılaştırıldığında ise sadece 2. grupta, 1. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur (P=0.006; Tablo 5).

Hematoksilen-Eosin boyanmış preparatların kullanımıyla gerçekleştirdiğimiz seminifer tübül çaplarının; 2., 3. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (sırasıyla P=0.009, P=0.006, P=0.009; Tablo 5). İkinci ile 3. grup değerleri karşılaştırıldığında ise 3. grupta, 2. gruba göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir (P=0.006; Tablo 5). Ancak 2. ve 4. grupların değerleri arasında anlamlı herhangi bir fark bulunamamıştır (P=0.076; Tablo 5). Fukoidan uygulamasına, diyabet indüksiyonundan hemen sonra ya da 15 gün sonra başlanması seminifer tübül çaplarını etkilememiş, 3 ve 4. grup değerleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (P= 0.465; Tablo 5).

Periyodik asit shiff-Hemalen boyası uyguladığımız preparatları kullanarak ölçülen bazal membran kalınlıkları ise 2. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı olarak artarken (P=0.028, P=0.011; Tablo 5), 3. grup ile 1. grubun bazal membran kalınlıkları arasında

anlamli bir fark tespit edilmemiştir (P=0.855). Üçüncü ve 4. grupların bazal membran kalınlıkları, 2. gruba göre anlamli olarak azalmıştır (sırasıyla P=0.015, P= 0.032; Tablo 5). DM indüksiyonu sonrası hemen fukoidan uygulanan 3. grup ile fukoidan uygulanmasına 15 gün sonra başlanan 4. grubun bazal membran kalınlık ortalamaları karşılaştırıldığında ise 3. grupta istatistiksel olarak anlamli bir azalma saptanmıştır (P=0.016; Tablo 5).

Tablo 5. Testis uzunluk ve genişlik, seminifer tübül çapı ve bazal membran kalınlık ölçümleri

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup
Testis Uzunluğu (cm)	2.07 ± 0.11	1.80 ± 0.18*	1.81 ± 0.87*	1.76 ± 0.11*
P		0.014*	0.007* 0.828†	0.007* 0.516† 0.365‡
Testis Genişliği (cm)	1.12 ± 0.25	0.96 ± 0.14*	1.06 ± 0.06	0.98 ± 0.15
P		0.006*	0.062* 0.161†	0.066* 0.826† 0.196‡
Seminifer tübül çapı (µm)	299.96 ± 3.48	218.94 ± 25.38*	279.20 ± 4.87*†	270.12 ± 38.77*
P		0.009*	0.006* 0.006†	0.009* 0.076† 0.465‡
Bazal membran kalınlığı (µm)	1.13 ± 0.12	1.85 ± 0.40*	1.14 ± 0.17†	1.42 ± 0.10*†‡
P		0.028*	0.015†	0.011* 0.032† 0.016‡

*: 1. grup ile karşılaştırıldığında, †: 2. grup ile karşılaştırıldığında, ‡: 3. Grup ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamli kabul edilmiştir.

JOHNSEN SKORLAMASI

Tüm deney gruplarından elde edilen ortalama Johnsen skor değerleri, 1. grup değerleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamli bir azalma tespit edilmiştir (tüm gruplar için P<0.05; Tablo 6). İkinci grup ile 3. grup kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise 3.gruptaki Johnsen skor değerlerinin anlamli derecede yüksek olduğu (P=0.003; Tablo 6) ve aynı şekilde 2 ve 4. gruplar kıyaslandığında ise 4. grup değerlerinin istatistiksel bir anlamlılıkla artış gösterdiği (P=0.003; Tablo 6) saptanmıştır. Fukoidanın farklı zamanlarda uygulandığı gruplar arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir (P=0.198; Tablo 6).

Tablo 6. Johnsen skorlaması değerleri

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup
Johnsen skorlaması Ort. \pm Ss. (Min. – Max.)	8.76 \pm 0.20 (8.55-9.00)	6.47 \pm 0.23* (6.15-6.70)	7.73 \pm 0.48* [†] (7.35-8.65)	7.38 \pm 0.17* [†] (7.10-7.65)
P		0.004*	0.018* 0.003[†]	0.006* 0.003[†] 0.198 [‡]

*: 1.grup ile karşılaştırıldığında, [†]: 2. grup ile karşılaştırıldığında, [‡]: 3. grup ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

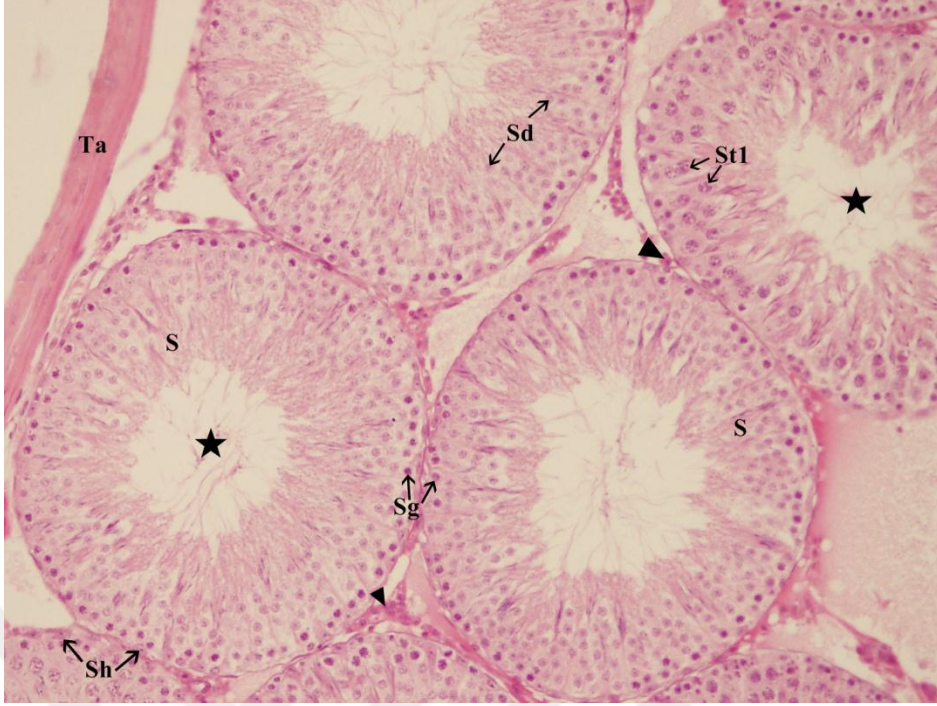
MORFOLOJİK BULGULAR

Birinci Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

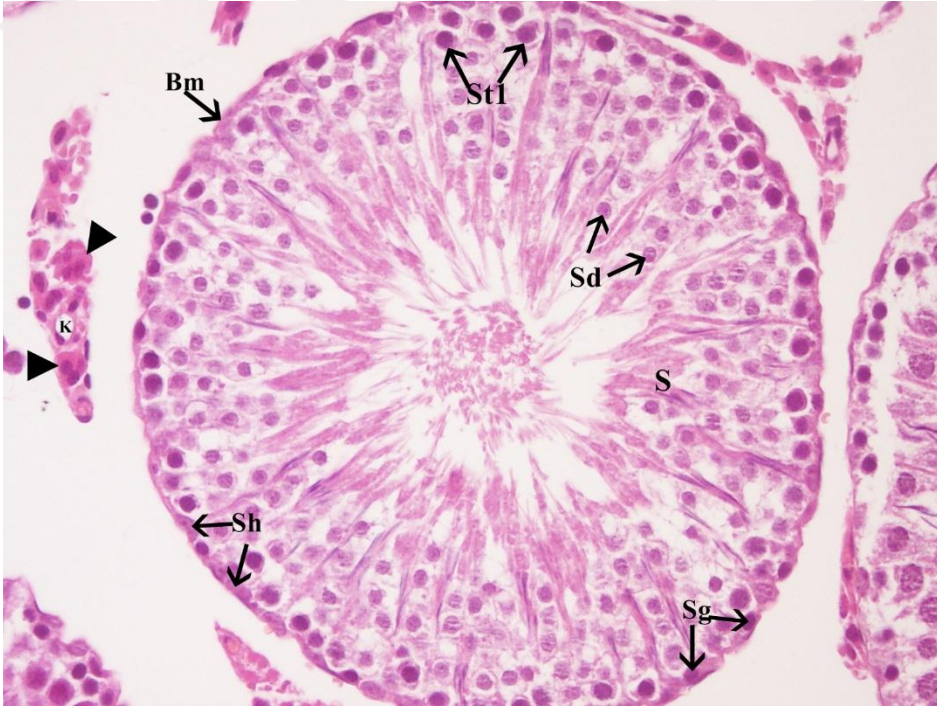
Birinci gruba ait H-E ve PAS-HI boyaları ile boyanmış 5 μ m kalınlığındaki kesitler incelendiğinde; testis dış yzeyinde bulunan bağ doku tabakası Tunica albuginea (şekil 2) ve seminifer túbül duvarını döşeyen spermatogenik seri hücrelerinde, organizasyon bütünlüğü gözlenmiştir (şekil 2-5).

Seminifer túbül epitelinin bazal membranından itibaren, túbül lümenine doğru; spermatogenik seri hücrelerinin spermatogonyum, spermatozoid-I, spermatozoid-II, erken ve geç spermatozoidlerin sırası ile yer aldığı ve spermaların, Sertoli hücre sitoplazmasına gömülü bir şekilde bulunduğu, kuyruklarının lümenine doğru yer aldığı izlenmiştir (şekil 2-5).

Spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri bazal membran üzerinde yer almaktadır. Spermatozoid-I hücreleri, spermatogonyumların üzerinde yerleşmiş, belirgin nükleusları ve diğer spermatogenik seri hücrelerine nazaran daha geniş sitoplazmaları ile túbül duvarında ayırt edilebilmektedirler. Testis kesitlerinde seminifer túbül duvarında nadiren gözlenebilen spermatozoid II'ler, hemen spermatozoid I'lerin üzerinde bulunmaktadır. Spermatozoidler ise lümenine yakın konumlarıyla, seminifer túbüllerin normal histolojik yapısı ile bir bütünlük oluşturmaktadır (şekil 2,3).



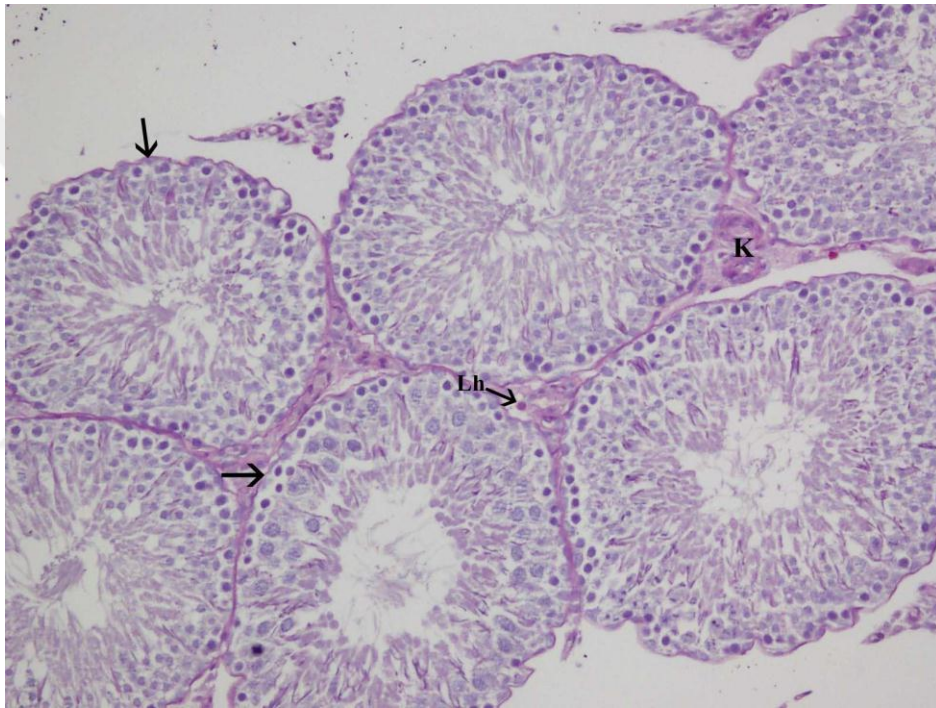
Şekil 2. Birinci grup testis kesitinde; normal yapıda seminifer tübüller(*), Tunica albuginea (Ta), Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), Leydig hücreleri (▶) ve spermler (S) izlenmektedir. H-E, X200.



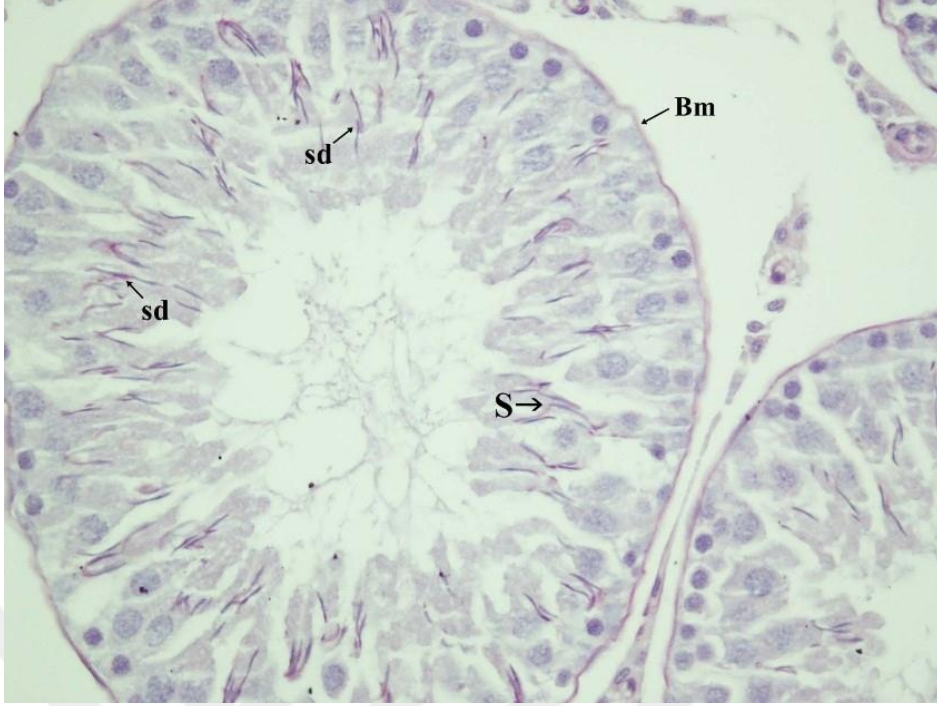
Şekil 3. Birinci gruba ait bu mikrografta seminifer tübüllerde; bazal membran (Bm), Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), Leydig hücreleri (▶), kan kapilleri (K) ve spermler (S) gözlenmektedir. H-E, X400.

Bu bulgulara ek olarak, PAS-HI boyası uygulanmış kesitlerde; PAS (+) reaksiyon veren bazal membran üzerine yerleşmiş, germinal seriye ait hücreler ve yine PAS (+) akrozom yapılarıyla dikkat çeken, küçük koyu nükleusları ile tanınan geç spermatidler ve spermier izlenmektedir (Şekil 4,5).

Seminifer tübüller arasındaki interstisyel sahada yer alan Leydig hücreleri, hem H-E hem de PAS-HI boyanmış kesitlerde genellikle poligonol şekilleri, eosinofilik boyanmış sitoplazmaları ve kan damarları etraflarındaki yerleşimleri ile diğer hücrelerden kolayca ayırt edilebilmektedir (Şekil 2-5).



Şekil 4. PAS (+) reaksiyon veren bazal membran (→) ve interstisyel sahadaki kan kapillerleri (K) ve Leydig hücreleri (Lh) izlenmektedir. PAS-HI, x200.

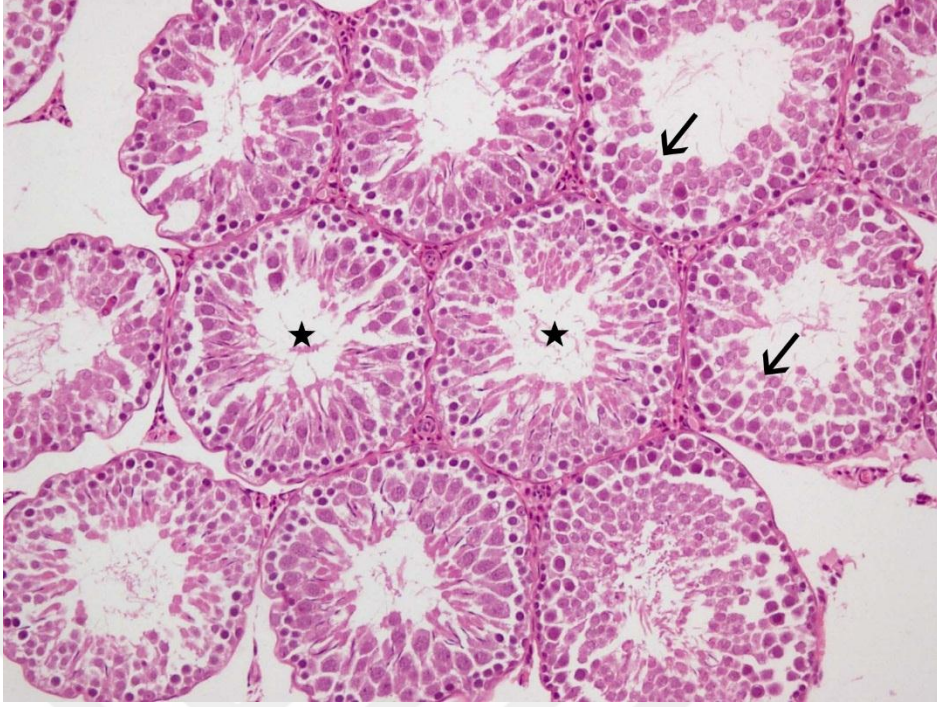


Şekil 5. Birinci grup seminifer tübüllerinde; PAS (+) bazal membran (Bm), geç spermatidlerin (sd) ve spermelerin (S) akrozomları görülmektedir. PAS-HI, x400.

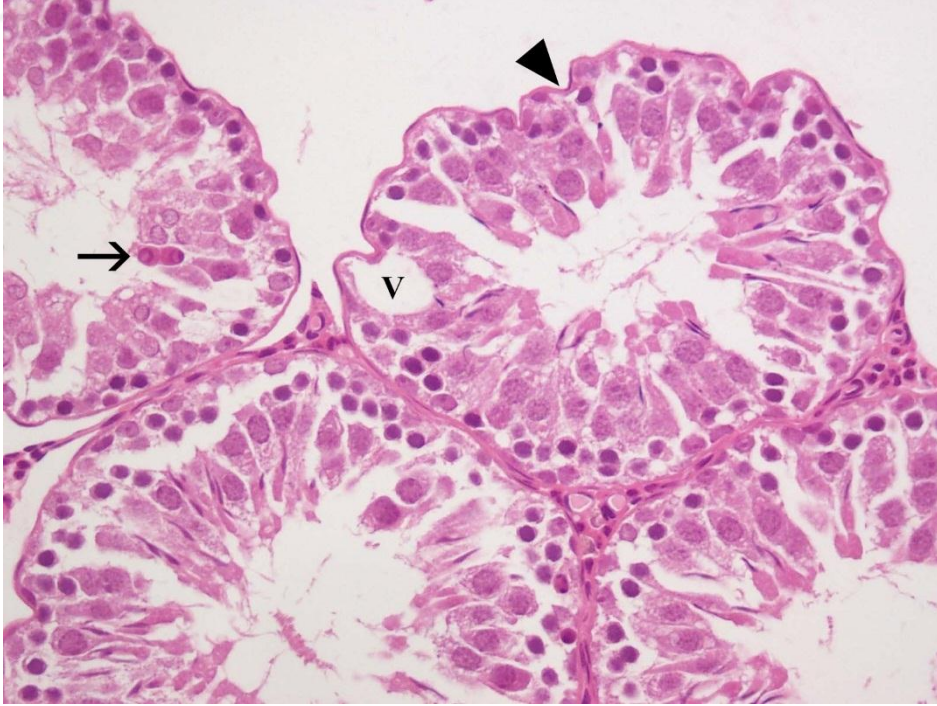
İkinci Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

İkinci gruba ait H-E kesitlerinde gerçekleştirilen seminifer tübül çapları değerlendirilmesinde, 1. gruba göre tübül çaplarının anlamlı derecede azaldığı tespit edilen bu grupta ($P=0.009$; Tablo 5), seminifer tübüllerin şekillerinde de değişimler izlenmiştir. Tübül çaplarının küçülmesine bağlı olarak yer yer tübüllerin birbirinden ayrıldığı, ancak bu mesafelerin bağ doku tarafından doldurulmaya çalışıldığı dikkati çekmektedir (Şekil 6-10).

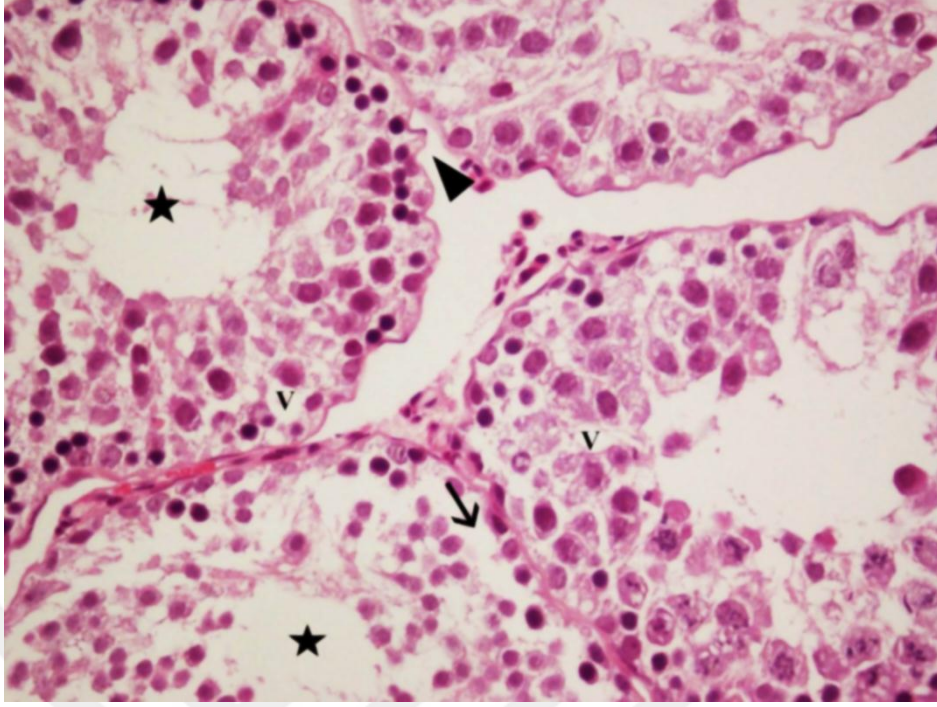
Bazal membrandan itibaren, seminifer tübül lümenine doğru olan spermatogenik seri hücre organizasyonunda gözlemlenen bozulmalar, neredeyse tüm germinal seri hücrelerinde vakuolizasyonlar ve seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmaların bulunması, bu grupta izlenen önemli bulgular olarak dikkati çekmektedir (Şekil 6-9).



Şekil 6. İkinci grupta çapları küçülen seminifer tübüller (*) ve spermatogenik seri hücrelerinde düzensizlik (→) dikkat çekmektedir. H-E, x200.



Şekil 7. Seminifer tübüllerinde; dev hücre gelişimi (→), germinal seri hücrelerinde vakuolizasyonlar (v) ve bazal membranda ondülasyonlar (▴) göze çarpmaktadır. H-E, X400.

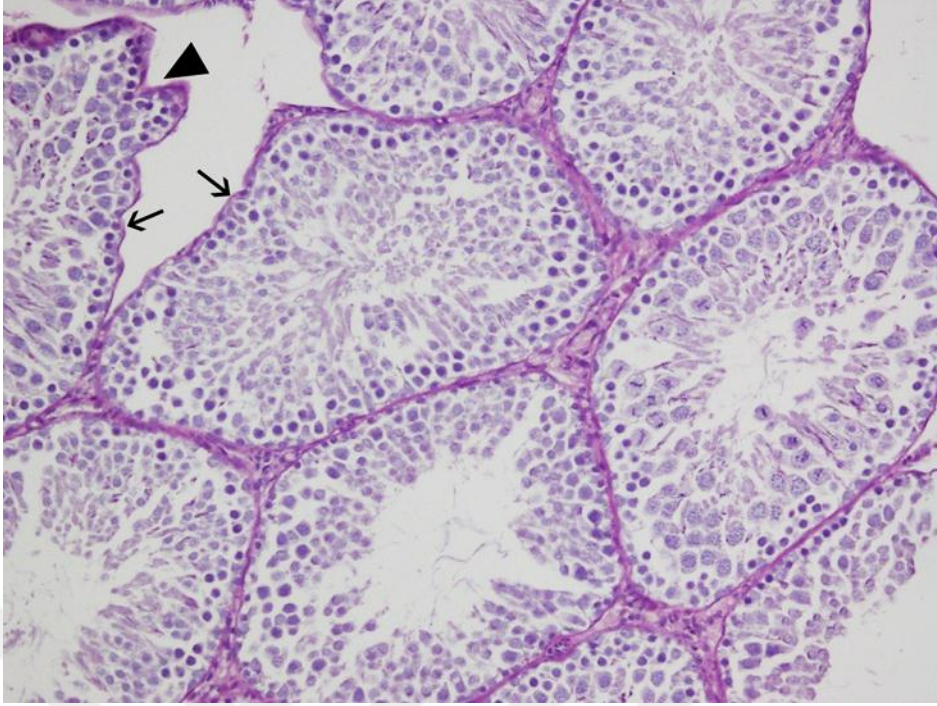


Şekil 8. İkinci grup testis kesiti seminifer tübüllerinde; spermatogenezin tam olarak izlenmediği tübüller (*), bazal membran ondülasyonları (▶), vakuolizasyonlar (v), bazal membran ile spermatogenik seri hücreleri arasındaki ayrışmalar (→) dikkat çekmektedir. H-E, x400.

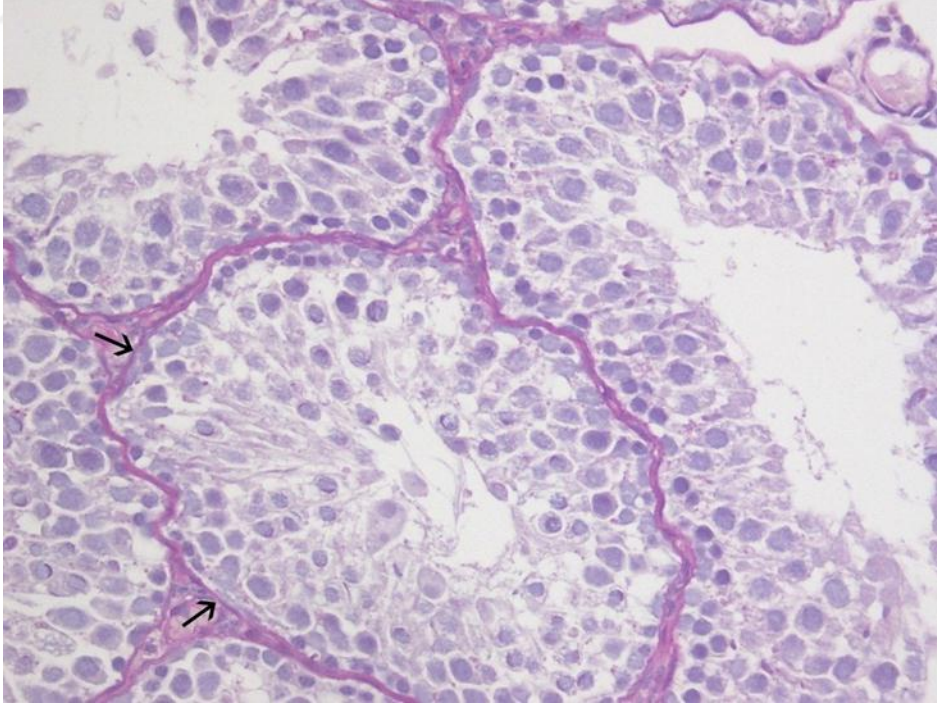
Ayrıca tübül lümenine yakın ya da lümeninde normalde bulunmaması gereken, henüz olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülen germinal seri hücrelerin varlığı ve bazı tübüllerde spermatogenik seriye ait tüm hücrelerin bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 8-10). Sadece spermatogonyum, spermatosit-I ve Sertoli hücrelerinden oluşan seminifer tübüllerin yanı sıra, tüm seri hücrelerini bulunduran tübüller de bulunmaktadır (Şekil 6,7). Bu gruba ait tüm kesitlerde ve her sahada olmasa da, bazı tübüllerde dev hücre gelişimi gözlemlenmiştir (Şekil 7,8).

Periyodik asit shiff (+) reaksiyon veren bazal membranlarda, 1. gruba kıyasla kalınlaşma ile birlikte ($P=0.028$; Tablo 5), çoğu tübülde gözlenen ondülasyonlar (bazal membran içe katlanmaları) bulunmaktadır (Şekil 9,10).

Normal yapısından farklı olan seminifer tübüllerin etrafını çevreleyen interstisyel bağ dokusundaki artış, diyabetik testis dokusunda izlenen bulgulardan biridir (Şekil 6).



Şekil 9. İkinci grup seminifer tübüllerinde; kalınlaşmış (→) ve ondülasyonlar yapmış (▴) bazal membranlar izlenmektedir. PAS-HI, x200.

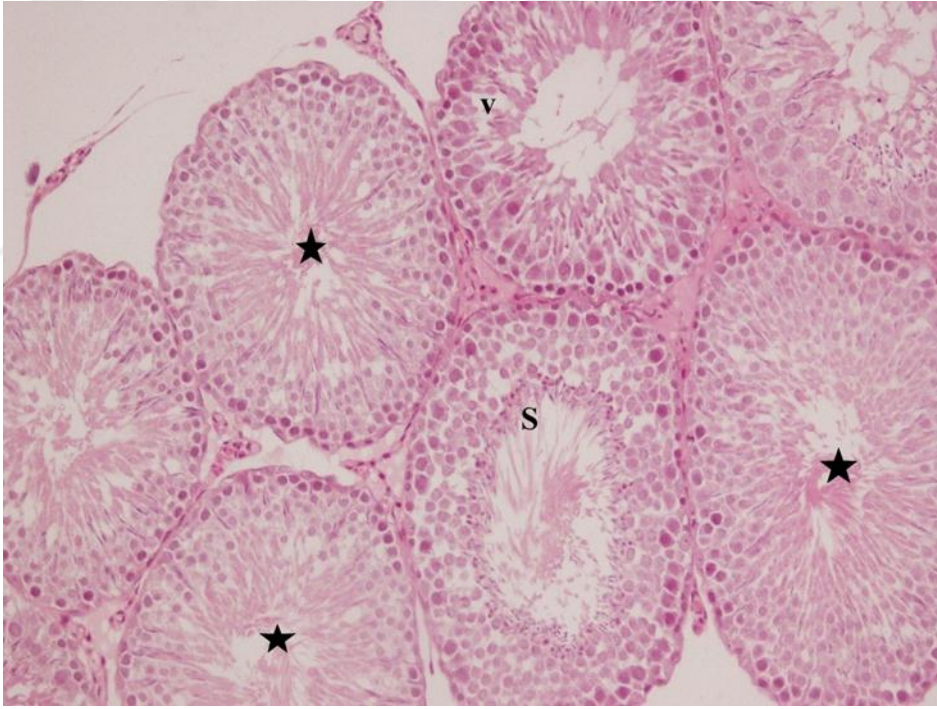


Şekil 10. Bu gruba ait testis doku kesitlerinde, kalınlaşmış bazal membranlar (→) dikkat çekmektedir. Spermatogenezin son aşamalarındaki hücreler gözlenmediğinden, akrozom yapısı ayırt edilememektedir. PAS-HI, x400.

Üçüncü Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

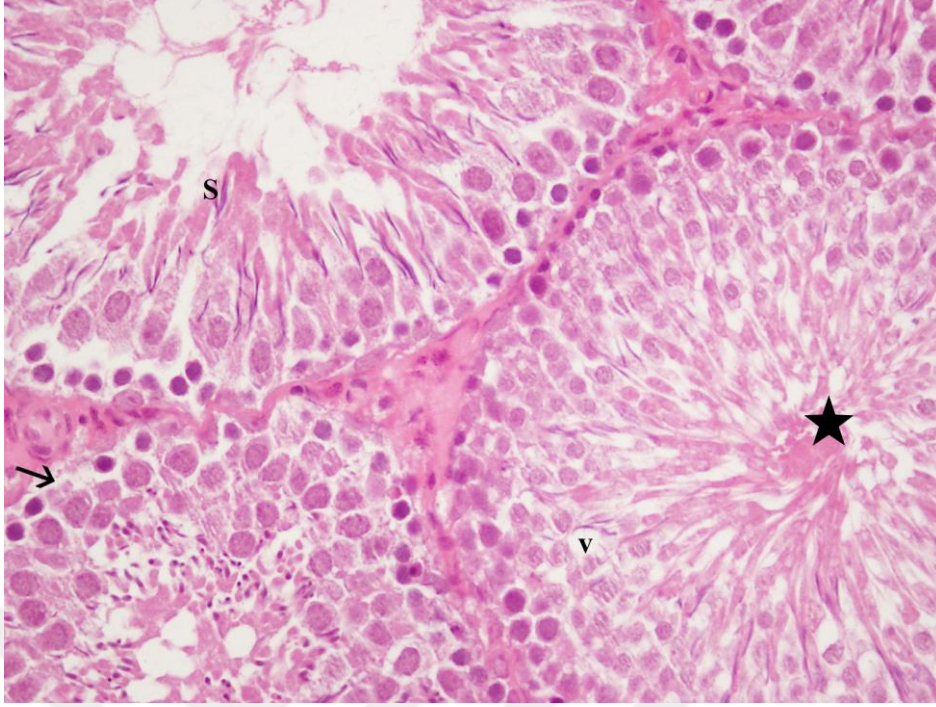
Diyabet oluşturulduktan hemen sonra fukoidan uygulanmaya başlanan bu gruba ait kesitlerde, 1. gruba göre; tübül çaplarının anlamlı olarak azaldığı gözlenmesine karşın (P=0.006; Tablo 5), 2. grubun tübül çaplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış (P=0.006; Tablo 5) olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 11).

Seminifer tübüllerin bazal membranından, tübül lümenine doğru sırası ile spermatogonyumlar, spermatosit I'ler, spermatosit II'ler, erken ve geç spermatidler ile birlikte Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasına gömülü baş kısımlarıyla spermlerin yer aldığı tübüller daha çok izlenmektedir. Johnsen skorlaması sonuçlarına paralel olarak, bu gruptaki tübüllerde, 2. gruba kıyasla, spermatogenik hücre seri organizasyonunun daha düzenli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11-14).



Şekil 11. Üçüncü grup testis kesitinde; normale yakın çaplı (*), spermlerin gözlendiği (S), ancak bazı tübüllerde yer yer vakuolizasyonların (v) bulunduğu izlenmektedir. H-E, x200.

Ancak bazı seminifer tübüllerde; az sayıda spermatid ve spermlerin gözlenebildiği ya da spermlerin hiç bulunmadığı da izlenmiştir. Germinal seri hücrelerinde sitoplazma kayıpları, vakuolizasyonlar ve ayrıca seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrımaların bulunması dikkati çekmektedir (Şekil 11-14).

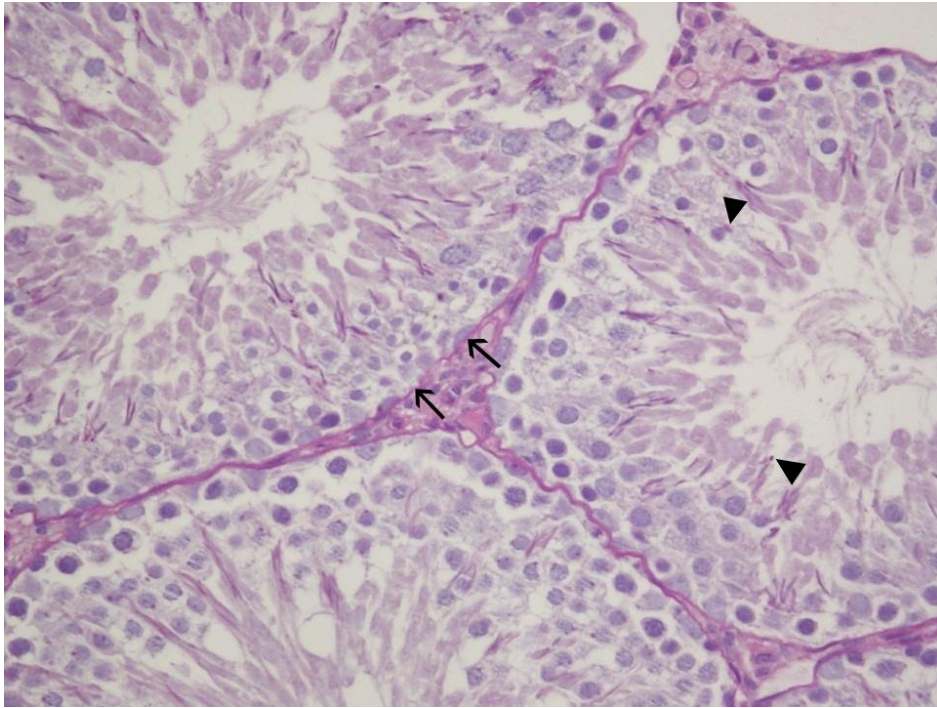


Şekil 12. Üçüncü grup seminifer tübüllerinde; organizasyon bütünlüğü (*) ve spermlerin bulunmasının (S) yanı sıra, yer yer vakuolizasyonlar (v) ve bazal membran ayrılmaları (→) göze çarpmaktadır. H-E, x400.

Diyabet oluşturulduktan sonra, fukoidan tedavisi uygulanan bu grubun tübüler bazal membran kalınlıkları (Ortalama $1.14 \pm 0.17 \mu\text{m}$; Tablo 5); Şekil 13 ve 14'te izlendiği gibi, 1. grup değerlerine (Ortalama $1.13 \pm 0.12 \mu\text{m}$; Tablo 5) oldukça yakın bulunmuştur. İkinci grup ile arasındaki fark ise PAS-HI mikrografları incelendiğinde açıkça fark edilebilmektedir (Şekil 10,14).



Şekil 13. Üçüncü grup seminifer tübüllerinde; Tunica albuginea'da bütünlük (Ta), normale yakın kalınlıkta bazal membranlar (→) görülmektedir. PAS-HI, X200.

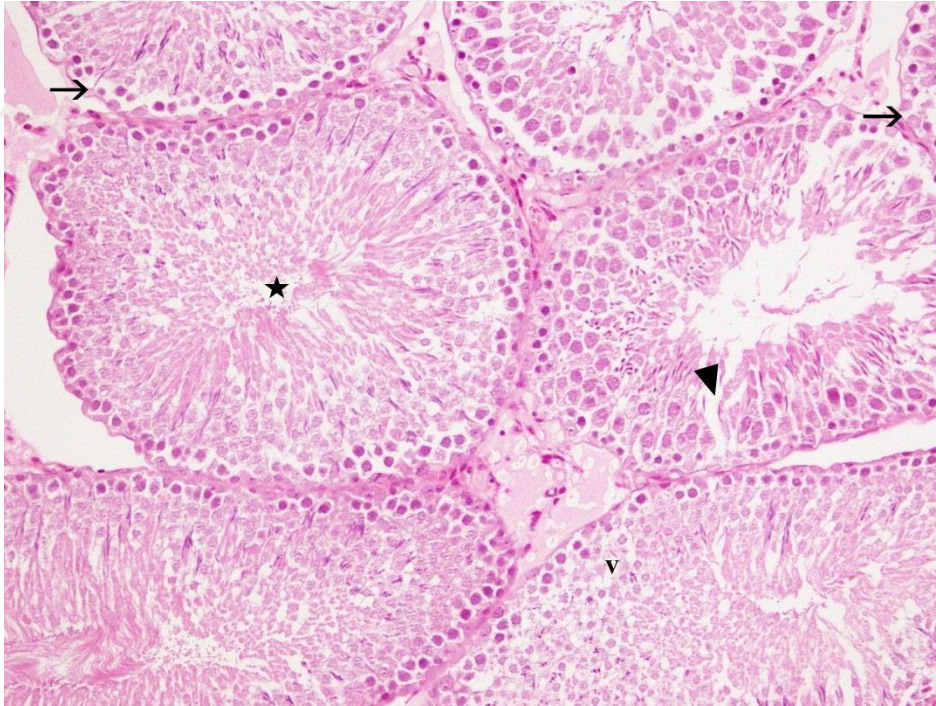


Şekil 14. Üçüncü grup kesitlerinde düzgün bazal membran yapılarının yanında, bazı tübüllerde ondülasyonlar da izlenmektedir (→) ve PAS(+) akrozom yapıları görülmektedir (▴). PAS-HI, X400.

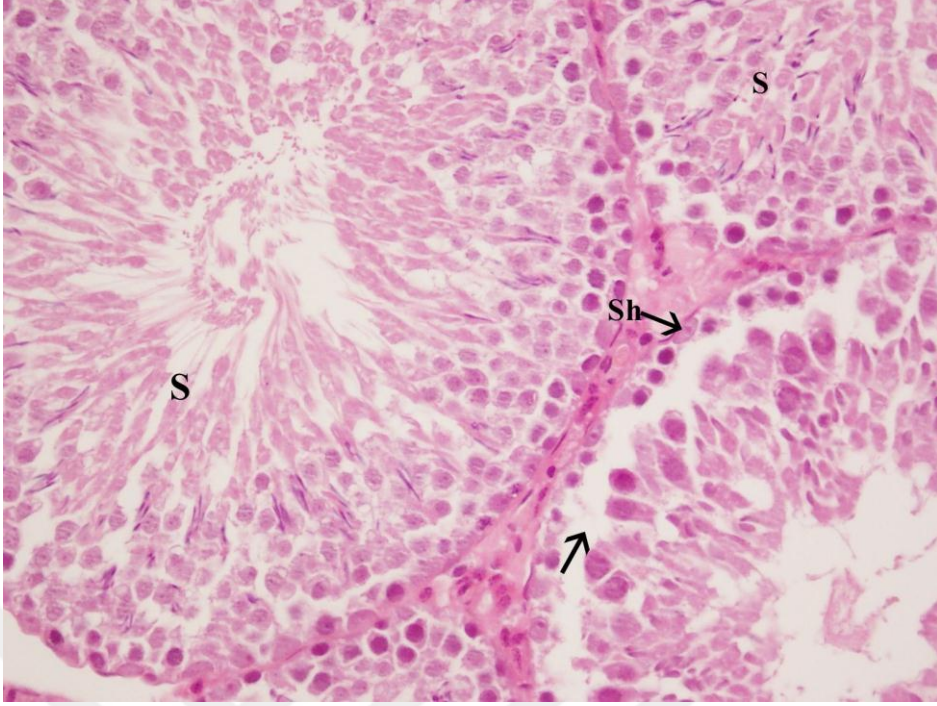
Dördüncü Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

Diyabet oluşturulduktan 15 gün sonra fukoidan uygulanmaya başlanan bu gruba ait kesitler, 1. grup ile kıyaslandığında, tübül çaplarındaki anlamlı azalma ($P= 0.009$; Tablo 5) Şekil 2 ve Şekil 15'te izlenebilmektedir. Bu gruba ait tübül çapları değerleri, 2. ve 3. grup ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $P=0.076$, $P= 0.465$; Tablo 5) .

Hematoksilen-Eosin boyanmış dördüncü grup kesitlerinde, normal yapıda seminifer tübüller izlenmekle birlikte; tübüllerde spermatogenik seri hücrelerindeki vakuolizasyonlar ve Sertoli hücre bağlantılarındaki zayıflamalar, özellikle 2. gruba kıyasla daha az izlenmektedir (Şekil 15,16). Ayrıca bazı tübüllerde spermatid ve spermilerin yokluğuyla birlikte, germinal epitel hücreleri ile bazal membranları arasındaki ayrılmalar da göze çarpmaktadır (Şekil 15-17).

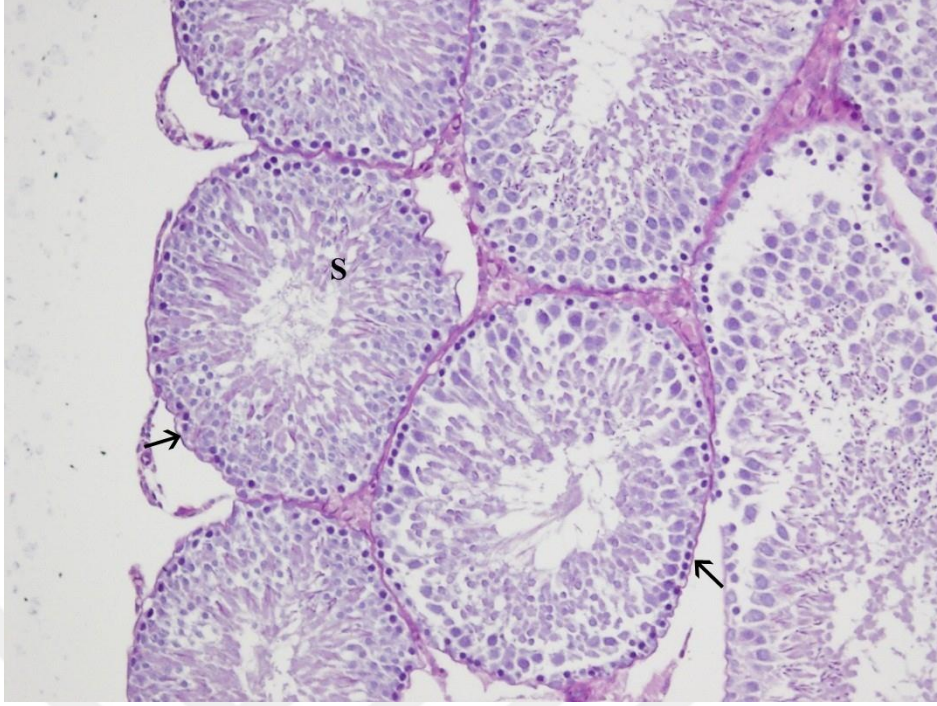


Şekil 15. Dördüncü grup kesitlerinde; organizasyon bütünlüğü gösteren ve sperm bulunduran tübüllerin (*) yanı sıra spermatogenik seri hücreleri (▶) ve bazal membran ile germinal epitel arasında ayrılmaların (→), vakuolizasyonların (v) bulunduğu tübüllerde göze çarpmaktadır. H-E, X200.

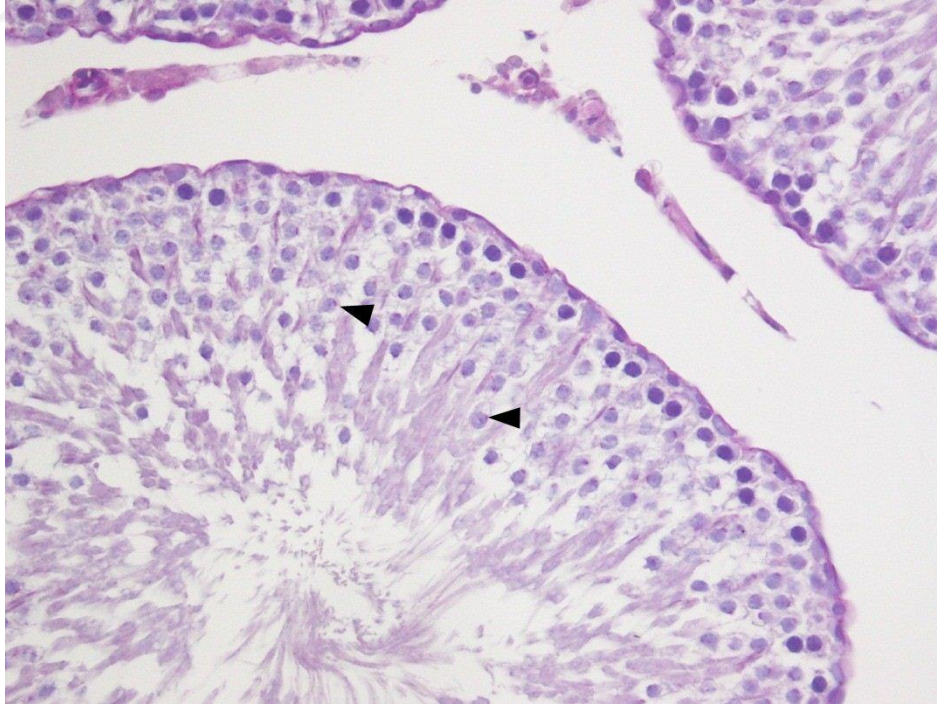


Şekil 16. Dördüncü grup kesitlerde; seminifer tübüllerde bulunan sperm (S) ve bazı tübüllerde ayrışmalar (→), Sertoli hücreleri (Sh) gözlenmektedir. H-E, x400.

Bu grubun; PAS (+) reaksiyon veren bazal membran kalınlıklarının, 1. ve 3. gruba göre arttığı (sırasıyla $P=0.011$, $P=0.016$; Tablo 5) ve 2. gruba kıyasla istatistiksel olarak azaldığı ($P=0.032$; Tablo 5) tespit edilmiştir. Diyabetik testis dokusunda izlenen belirgin bulgulardan biri olan bu parametrenin, fukoidan etkisinde olduğu Şekil 17 ve 18'de izlenmektedir.



Şekil 17. Dördüncü grup seminifer tübüllerinde; PAS (+) boyanmış yapılar izlenmektedir. Bazal membran (→), spermler (S). PAS-HI, X200.



Şekil 18. Bu gruba ait kesitlerde, PAS-HI boyanan bir mikrograf görülmektedir. Spermatidlerin akrozomları (►) izlenmektedir. PAS+HI, X400.

TUNEL Bulguları

Tüm gruplara uygulanan TUNEL metodu ile apoptotik hücreler belirlenmeye çalışılmış ‘apoptotik tübül indeksi’ ve ‘apoptotik hücre indeksi’ yöntemleri kullanılarak apoptozis değerlendirilmiştir.

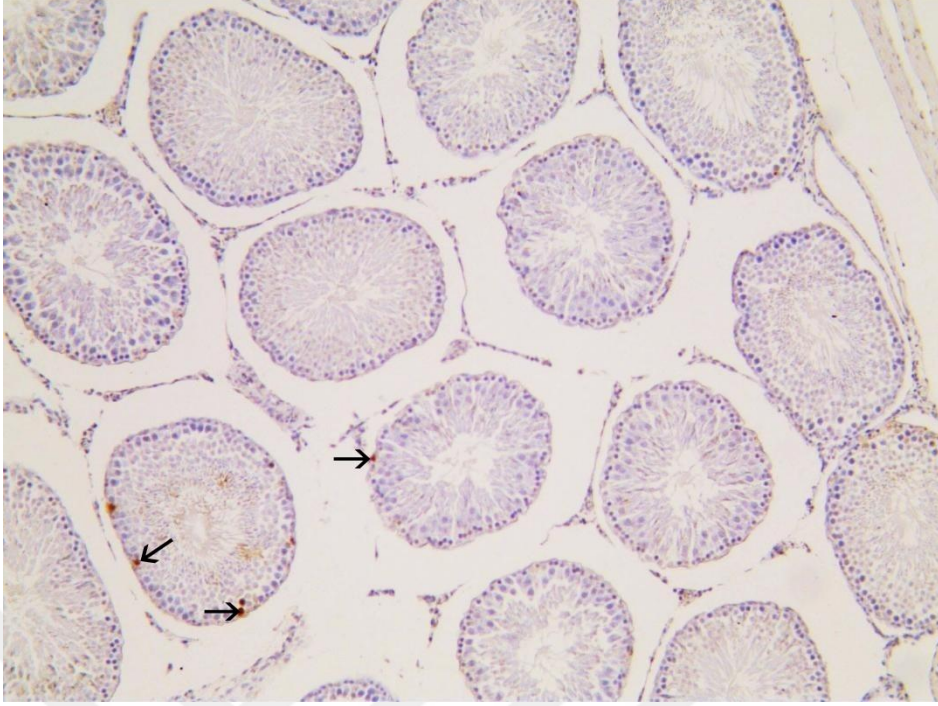
Deney gruplarında apoptotik tübül indekslerinin; 1. gruba göre, 2., 3. ve 4. gruplarda anlamlı derecede artarken (sırasıyla $P=0.008$, $P=0.006$, $P=0.008$; Tablo 7); üçüncü ve 4. grup değerlerinde 2. gruba göre istatistiksel bir azalma tespit edilmiştir (sırasıyla $P=0.035$, $P=0.009$; Tablo 7).

Apoptotik hücre indeksi sonuçları gruplar arasında kıyaslandığında ise 1. gruba göre tüm gruplarda artış izlenirken ($P<0.05$; Tablo 7); fukoidan verilen 3. ve 4. gruplardaki değerler 2. grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla $P=0.006$, $P=0.008$; Tablo 7) gözlenmiştir. DM indüksiyonu yapıldıktan sonra farklı zamanlarda fukoidan uygulanmaya başlanan gruplar arasında ise apoptotik tübül indeksi açısından bir farklılık bulunmamıştır ($P=0.408$). Apoptotik tübül indeksi değerlerinde olduğu gibi, apoptotik hücre indeksi değerlerinde de 3. ve 4. gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P=0.513$; Tablo 7).

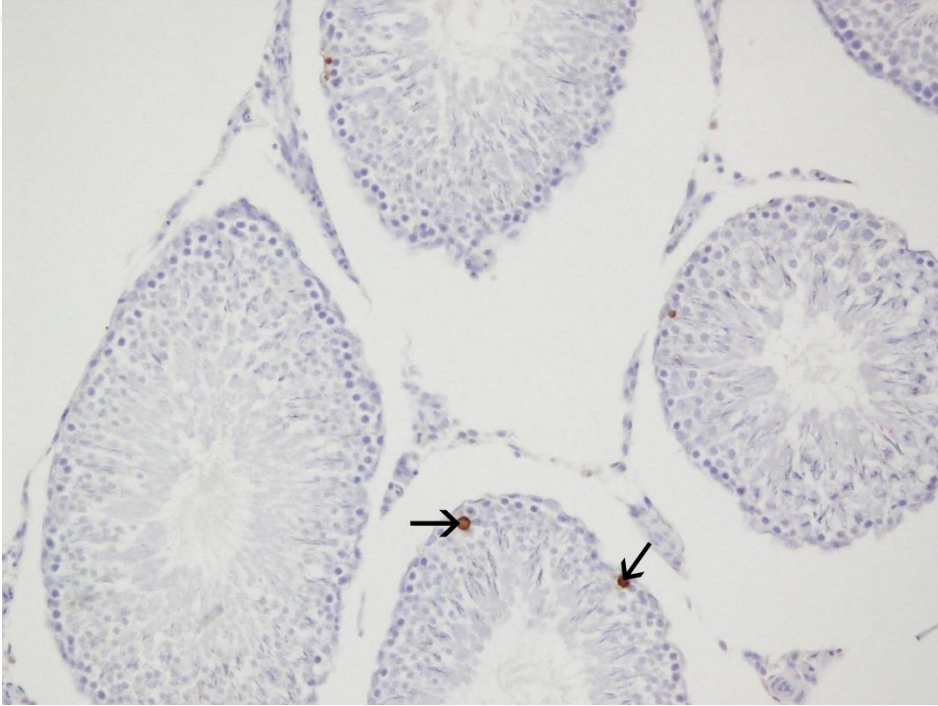
Tablo 7. Apoptotik tübül ve hücre indeksi

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup
Apoptotik tübül indeksi	6.60 ± 1,94	25.80 ± 4.81*	16.66 ± 7.58* [†]	13.00 ± 3.39* [†]
P		0.008*	0.006* 0.035[†]	0.008* 0.009[†] 0.408[‡]
Apoptotik hücre indeksi	3.20 ± 1.30	19.60 ± 3.78*	6.83 ± 1.72* [†]	6.00 ± 2.00* [†]
P		0.009*	0.013* 0.006[†]	0.043* 0.008[†] 0.513[‡]

*: 1. grup ile karşılaştırıldığında, †: 2. grup ile karşılaştırıldığında, ‡: 3. grup ile karşılaştırıldığında, $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 19. Birinci gruba ait seminifer tübül kesitlerinde, az sayıda TUNEL pozitif hücre (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X100.

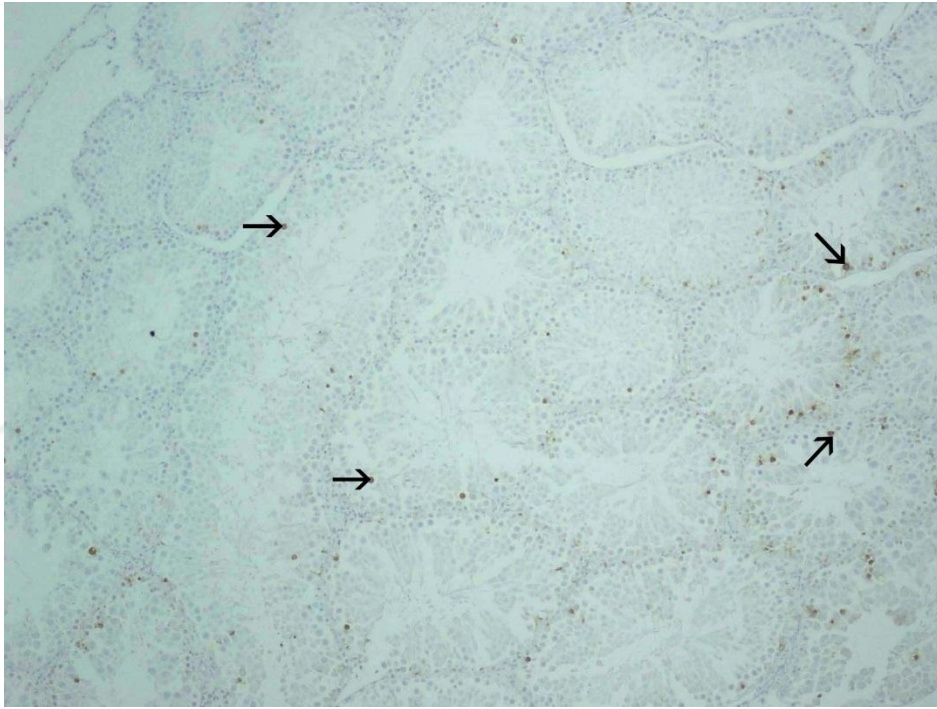


Şekil 20. Birinci gruba ait kesitte TUNEL pozitif hücreler(→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X200.

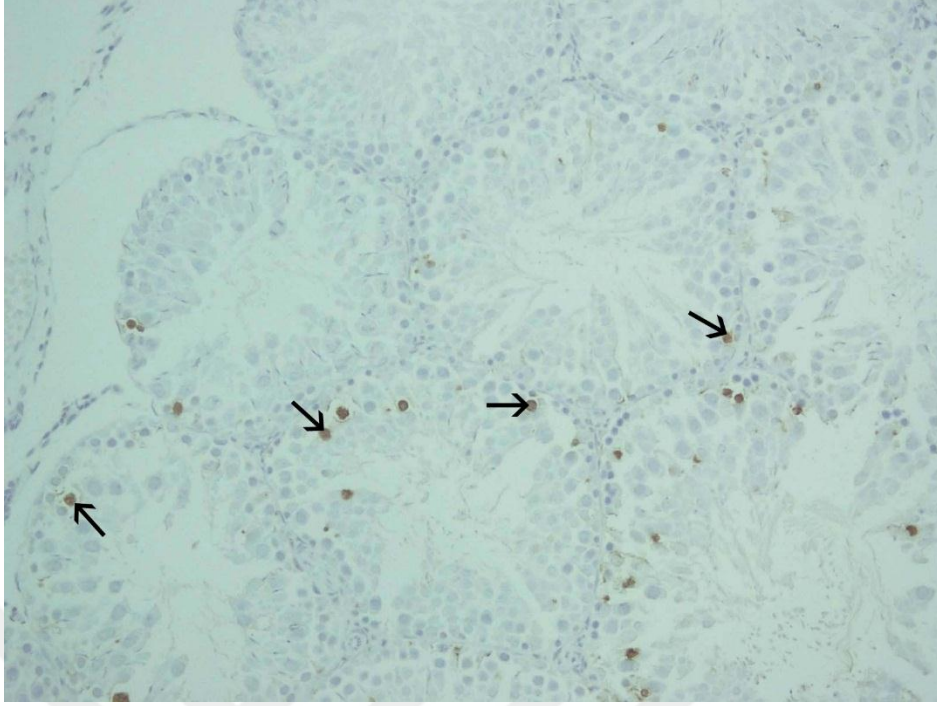
Birinci gruba ait testis kesitlerinde az sayıdaki TUNEL pozitif hücrelerin genellikle spermatogonyumlar olduğu gözlenmiştir (Şekil 19,20).

İkinci grupta ise çok sayıda spermatogonyumun yanında, spermatogenik seriye ait diğer hücrelerde de TUNEL pozitif reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 21,22).

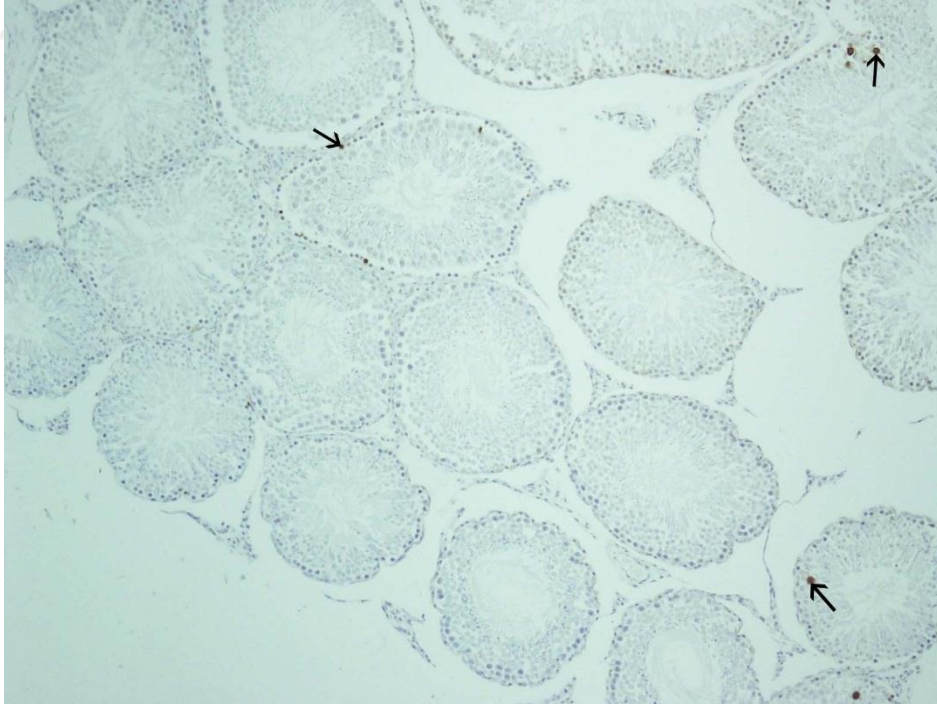
Fukoidan verilen 3. ve 4. gruplarda ise genellikle TUNEL pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin, diyabetik olan ikinci gruba kıyasla, daha az sayıda olduğu tespit edilmiştir. izlenebilmektedir (Şekil 23-26).



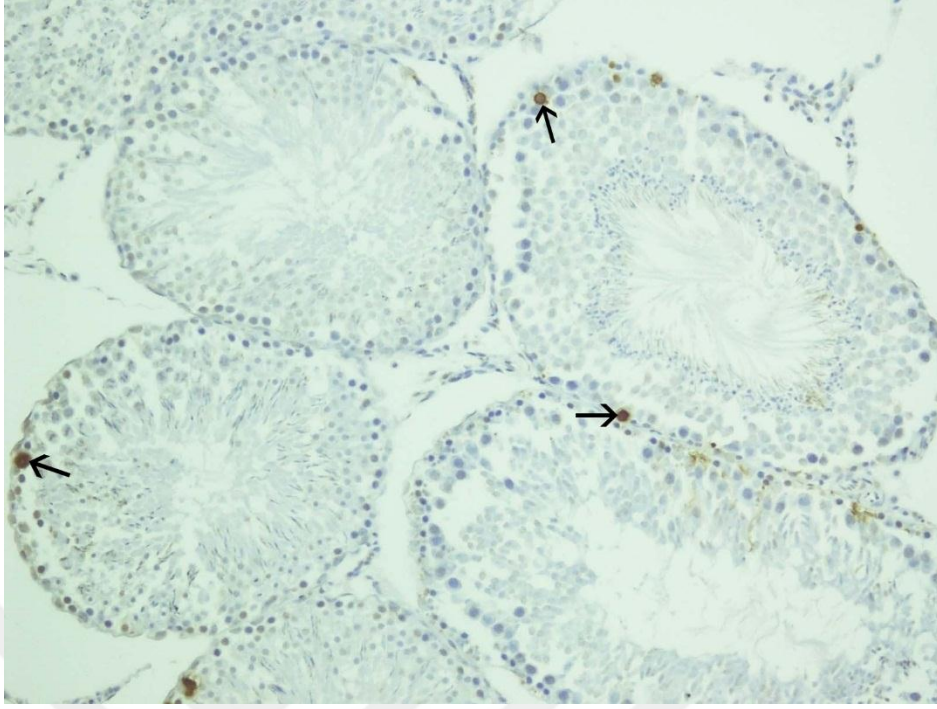
Şekil 21. İkinci gruba ait seminifer tübül kesitlerinde, organizasyon bozukluğuyla birlikte çok sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) dikkat çekmektedir. TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X100.



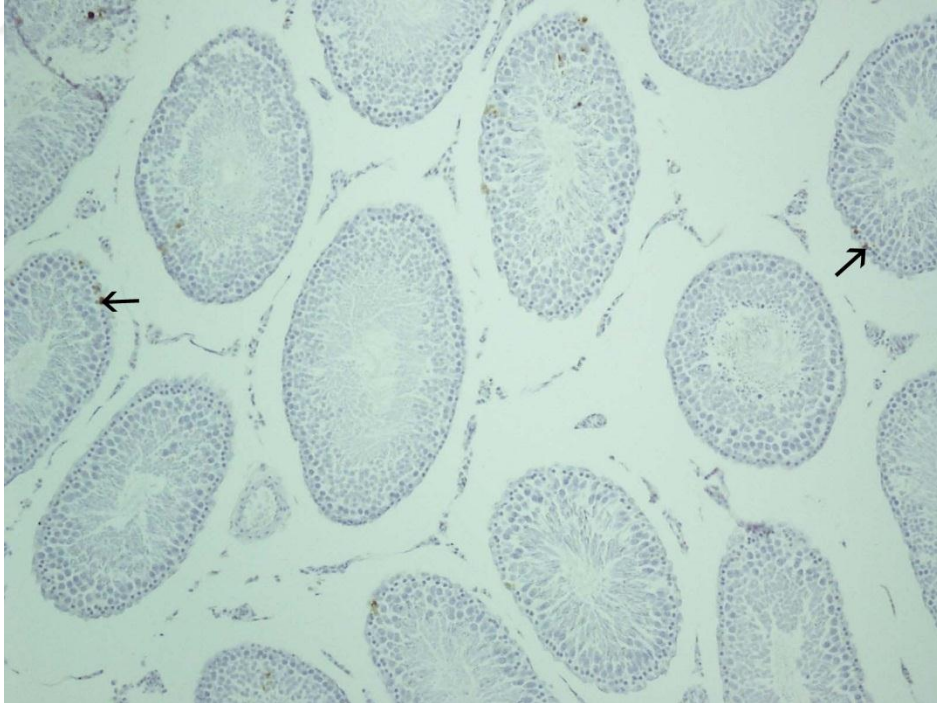
Şekil 22. İkinci gruba ait kesitte, çok sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X200.



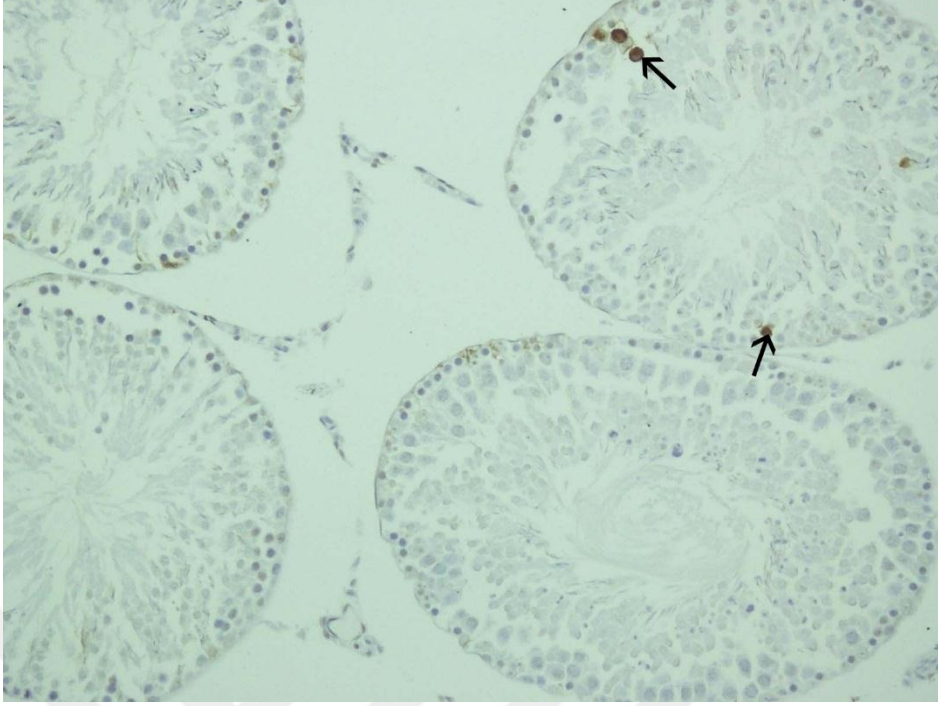
Şekil 23. Üçüncü gruba ait seminifer tübül kesitlerinde, TUNEL pozitif hücreler (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X100.



Şekil 24. Üçüncü grup seminifer tübül kesitlerinde, TUNEL reaksiyonu veren hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X200.



Şekil 25. Dördüncü gruba ait kesitlerde, az sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X100.



Şekil 26. Dördüncü grupta az sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) dikkati çekmektedir. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması, X200.

TARTIŞMA

Diyabetin birçok önemli komplikasyonlarının yanı sıra son zamanlarda erkek genital sistem üzerindeki etkileri de oldukça dikkat çekmektedir. Erkek infertilitesi ve diyabet ilişkisi, karanlıkta kalmış birçok yönü bulunan ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulan bir konudur. Diyabetin uzun süreli komplikasyonlarının ilaçlar ile tedavisi, ülkelere ağır bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Bu sebeple; hastalığın tedavisi için son zamanlarda, kan şekerini düzenleyici ve antioksidan içeriği yüksek olan doğal ürünlere yönelim söz konusudur (23,92,93).

Diyabetin erkek bireylerde; retrograd ejakülasyon, libido azalması ve erektil disfonksiyona sebep olması gibi sorunlar, birçok çalışmada vurgulanmıştır (8,9,11,66,67). Bunlarla birlikte; hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde meydana gelen değişiklikler ile birlikte testosteron seviyelerindeki düşüş, sperm sayı ve hareketliliklerinde azalma da diyabetin klinik bulgularındandır (9,13,93).

Diyabet ile birlikte insanlarda ortaya çıkan histopatolojik değişiklikler, sıçanlar üzerinde yapılan deneysel diyabet modelleriyle de izlenebilmektedir. Bu sebeple, diyabetin semptom ve komplikasyonlarının tedavisi, diyabet patogenezinin aydınlatılması için sıçanlar üzerinde oluşturulan deneysel modeller sıklıkla kullanılmaktadır. Deneysel diyabet oluşturmak için; genellikle STZ ve alloxan gibi kimyasal ajanlar, farklı doz ve sürelerde kullanılmaktadır (35,39,41).

Yapılan bu çalışmada, 5 ardışık gün 40 mg/kg STZ uygulaması ile sıçanlarda deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur (41,71,94). STZ uygulamasının ardından, diğer çalışmalarda

olduğu gibi (69,94,95) kan glukoz seviyeleri 250 mg/dl üzerinde olan denekler, diyabetik kabul edilmişlerdir.

Streptozotosin, pankreas β hücrelerine spesifik olarak etki ederek, insülin salgılanmasını azaltır. Azalan insülin salgısı ile birlikte, kan glukoz seviyeleri önemli ölçüde yükselmektedir (35). STZ kullanılarak diyabet oluşturulan birçok çalışmada da (94-96) kontrol grubuna kıyasla diyabet oluşturulan gruplarda, kan glukoz seviyelerinde önemli derecede bir artışın olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalara paralel olarak; STZ kullanarak diyabet oluşturulan 2., 3. ve 4. grupların kan glukoz seviyelerinde, 1. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış tespit edilmiştir. Fukoidanın kan glukoz homeostazına etkisi olduğunu ileri süren Kim ve ark. (23), genetik olarak diyabetik olan C57BL/KSJ db/db türü farelere 6 hafta boyunca 45 mg/kg fukoidan uygulamışlar ve kan glukoz seviyelerinde azalmaların olduğunu ileri sürmüşlerdir. Fakat bu araştırmacıların aksine, çalışmamızda diyabet indüksiyonundan sonra farklı zaman dilimlerinde (3. grup için son STZ enjeksiyonundan hemen sonra, 4. grup için son STZ enjeksiyonundan 15 gün sonra) 6 hafta boyunca gūnaşırı 50 mg/kg fukoidan verilen gruplar ile sadece diyabet indüksiyonu yapılan 2. grup arasında kan glukoz düzeyleri bakımından herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Wang ve ark. (19) ise STZ ile diyabet oluşturdukları *Wistar* ratlara; 8 hafta boyunca 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında fukoidan uyguladıkları çalışmalarında, sadece 300 mg/kg fukoidan verilen grupta kan glukoz seviyelerinde önemli ölçüde düşüş elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda, kan glukoz homeostazının düzenlenmesinde daha yüksek dozlarda fukoidan kullanılmasına ihtiyaç duyulabileceği kanısındayız. Ayrıca fukoidanın elde edildiği türe özgü kimyasal bileşimlerindeki farklılıkların da, etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz.

İnsülin hormonunun mutlak veya göreceli olarak azalması ya da glukoz intoleransı sonucunda, glukozun hücre içerisine alımında oluşan problemler nedeniyle, hücreler enerji kaynağı olarak kendi proteinlerini ve yağlarını kullanmaya başlarlar. Bunun sonucunda diyabet ile birlikte, azalan vücut ağırlığı tablosu ortaya çıkmaktadır. Diyabet etkisiyle vücut ağırlıklarında kayıpların gözlenmesi, birçok çalışma ile ortaya konmuştur (97-99). Bunlarla doğru orantılı olarak; çalışmamızda da, tüm gruplar arasında deney öncesi ölçülen vücut ağırlıklarında bir fark bulunmazken, deney sonunda ölçülen vücut ağırlıklarının; 2., 3., ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). İkinci grup ile 3. ve 4. gruplar arasında, vücut ağırlıkları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kim ve ark. yaptıkları iki farklı çalışmada (23,100), fukoidan uygulamasının besin alımını ve vücut

ağırlıklarını etkilemediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, diyabet grubu ile diyabet indüksiyonu sonrası fukoidan uygulanan gruplar arasında vücut ağırlıkları açısından bir fark bulunmaması, bu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Diyabet ile birlikte vücut ağırlıklarının yanı sıra, testis ağırlıklarında da bir azalmanın meydana geldiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (101-103). Sunulan bu çalışmada, deneklerin testis ağırlıkları; 2. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre azalırken, 1. ve 3. gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Üçüncü grup ile 1. grup değerlerinin birbirine yakın olması diyabetin testis dokusundaki etkileri ortaya çıkmadan başlanan fukoidan uygulanmasından kaynaklandığını ve böylece testis ağırlık kayıplarını önlemede etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Khaneshi ve ark. (18) diyabet ile birlikte, testis uzunluk ve hacminde bir azalma meydana geldiğini, fakat susam yağı uyguladıkları grupta, kontrol grubuna yakın değerler elde ettiklerini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda; diyabete maruz kalan 2., 3. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre testis uzunluklarında, anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Fakat antioksidan uyguladığımız gruplar ve diyabet grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Testis genişlik değerleri ise gruplar arasında karşılaştırıldığında; sadece 2. grupta, 1. gruba göre anlamlı bir azalma bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçların, diyabet etkisiyle meydana gelen, testis ağırlık azalmasıyla yakından ilişkili olduğu kanısındayız.

Diyabetik bireylerde hiperglisemiyle ortaya çıkan oksidatif stresin; testis dokusunda histopatolojik değişimlere yol açtığı bilinmektedir (7,57). Diyabetik sıçanların serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinde düşmelerin olduğu (8,70) ve bununla birlikte insülin yetersizliğinden kaynaklanan, insülin-aracılı hücre proliferasyonunun ve seminifer tübüllerdeki spermatogonyum sayılarının azalması sonucunda, seminifer tübül çaplarının da küçüldüğü bildirilmiştir (97,104). Diğer birçok çalışmada olduğu gibi (69,70,105), sunulan bu çalışmada da diyabete maruz kalan grupların seminifer tübül çaplarında, 1. gruba göre anlamlı bir azalmanın olduğu saptanmıştır. Fukoidanın DM indüksiyonu sonrası hemen uygulanmaya başlandığı 3. grup deneklerin tübül çaplarında, 2. gruba göre anlamlı derecede artış tespit edilirken; 15 gün sonra fukoidan uygulanmaya başlanan 4. grup ile 2. grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu bulgular bize; diyabet indüksiyonu sonrası lokal kan glukoz düzeylerinin testis dokusundaki etkileri ortaya çıkmadan hemen önce fukoidan uygulanmasının etkili olduğunu düşündürmektedir.

Cameron ve ark. (106) diyabete bağlı olarak, seminifer tübüllerin bazal membranlarında kalınlaşma tespit ettiklerini ve damar duvarlarında kalınlaşma ile zaten bozulan tübül beslenmesinin, bu kalınlaşma ile birlikte daha da bozularak, spermatogenezi olumsuz yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Leydig hücre disfonksiyonu ile birlikte azalan testosteron hormonu ve tübül bazal membranlarının kalınlaşması, testosteronun tübül içerisine diffzyonunu zorlaştırarak, spermatogenezi olumsuz yönde etkilemektedir (68). Guneli ve ark. (97) diyabetin, seminifer tübül bazal membranlarında kalınlaşmaya neden olduğunu ileri sürmüşler ve bulguları Sisman ve ark. (105) tarafından da desteklenmiştir. Bu çalışmalarla paralel olarak, morfometrik ölçümlerimiz sonucunda; 2. grupta, 1. gruba göre bazal membran kalınlıklarında anlamlı bir artış saptanmıştır. nc grupta tespit edilen bazal membran kalınlık ortalamaları, 1. grup değerlerine oldukça yakındır. Dördüncü grup değerlerinin ise 1. ve 3. gruplara göre istatistiksel anlamlılıkla yüksek olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, DM indüksiyonundan sonra hemen fukoidan uygulamasının, bazal membranlarda kalınlaşmayı önleyebileceğini düşündürmektedir. Ancak testis dokusunda deneysel diyabetin etkilerinin izlenebildiği 15. günden sonra fukoidan uygulanmasının, kalınlaşmış bazal membranlardan zorlukla gerçekleşen hormon ve madde diffzyonunu etkilemesinin, g olduğunu akla getirmektedir.

Johnsen (88) 1970 yılında seminifer tübüllerde spermatogenik maturasyon derecesine göre testis kesitlerini değerlendirebilmek için, Johnsen skorlamasını ortaya koymuştur. Sonraki yıllarda, bu skorlama yaygın olarak testis kesitlerindeki spermatogenezi değerlendirmek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (94,97,107). Çalışmamızda Johnsen skoru kullanarak yaptığımız değerlendirmede; 1. grup ile 2., 3. ve 4. gruplar arasında anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. nc ve 4. grupların Johnsen skor değerleri, 2. gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Diyabet indüksiyonu sonrası fukoidan uygulanan gruplarda, diyabet grubuna göre bütünlüğü korunmuş daha fazla tübül gözlemlenmesi bize; diyabetik bireylerde fukoidan uygulanmasının tübül histofizyolojisini, histopatolojisini ve özellikle spermatogenezi koruyucu etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Histolojik incelemelerimiz sonucunda 2. grubun testis doku kesitlerinde; spermatogenik seri hücrelerinde organizasyon bozukluğu, germ hücre kayıpları, atrofik tübüller, hücresel vakuolizasyonlar, normal olmayan spermatogenez, gelişimini tamamlayamadan tübül lümenine dökülen hücreler, bazı tübüllerde çok nükleuslu dev hücreler ve tübül bazal membranlarında kalınlaşmalar izlenmiştir. Bizim bulgularımıza benzer

bulgular Bozdemir (94) ve Amaral (7)'in çalışmalarında da gösterilmiştir. İkinci grupta ortaya çıkan bu değişimlerin, diyabet indüksiyonundan sonra farklı zamanlarda fukoidan uyguladığımız 3. ve 4. gruplarda belirgin şekilde ortadan kalktığı; Johnsen skoru, seminifer tübül çapı ölçümleri ve apoptotik indeksleme yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Diyabetin sebep olduğu testiküler disfonksiyon ile apoptozisin yakın ilişkili olduğu ve oksidatif stresin, apoptozisi indüklediği pek çok çalışmada bildirilmiştir (94,101). Çeşitli antioksidanların kullanımı ile serbest radikallerin süpürülmesiyle, germ hücre apoptozisinde gerilemelerin meydana geldiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (57,108,109). Hücrelerde apoptozisin son aşamasında meydana gelen, DNA parçalarının 3'-OH uçları TUNEL yöntemiyle işaretlenmekte ve çalışmalarda apoptozisi *in situ* olarak tanımlanmakta, sıklıkla kullanılmaktadır (104,105,110). TUNEL yöntemi kullanılarak, apoptotik tübül ve apoptotik hücre indeksleri değerlendirildiğinde; diğer çalışmalarda (101,111) olduğu gibi bizim çalışmamızda da, diyabet oluşturulan 2. grupta, 1. gruba göre anlamlı derecede bir artış bulunmuştur. Fukoidan uygulanan 3. ve 4. gruplarda ise 2. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. İndeksleme yöntemi sonuçlarına göre fukoidanın; diyabet ile birlikte ortaya çıkan apoptoziste etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Gerçekleştirilen bu çalışmanın tüm sonuçları değerlendirildiğinde; yurtdışında lisanslı olarak tüketici kullanımına sunulan fukoidanın, farklı doz ve sürelerde, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla da desteklenerek, diyabetik erkek infertilite tedavisinde ya da infertiliteden korunmak amacıyla da kullanılmasının mümkün olabileceği görüşündeyiz.

SONUÇLAR

Diyabet ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki, son yıllarda sıklıkla çalışılan bir araştırma konusudur. Fukoidanın çok güçlü bir antioksidan olması ve ayrıca diyabetik bireylerde kan glukoz homeostazını düzenleyici etkisi olduğunu gösteren çalışmalardan hareketle planladığımız bu projeden elde edilen bulguları kısaca özetleyecek olursak;

1. Deney sonunda ölçülen kan glukoz düzeyleri; 2., 3. ve 4. gruplarda, kontrol grubu olan 1. gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Ancak, diyabet indüksiyonundan sonra farklı zamanlarda 50 mg/kg fukoidan uygulanan gruplar ile sadece diyabet indüksiyonu yapılan grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.
2. Deney başlangıcında deneklerin vücut ağırlık ortalamaları birbirine yakın bulunmasına rağmen, deney sonu ölçümlerinde 1. grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı derece bir azalma görülmüştür ($P<0.05$).
3. Sakrifikasyondan sonra elde edilen sağ ve sol testis ağırlıklarının; 2. ve 4. gruplarda, 1. grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilirken (sırasıyla sağ testis $P=0.009$, $P=0.009$; sol testis $P=0.009$, $P=0.016$), 3. grupta kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır.
4. Sakrifikasyondan sonra ölçülen testis uzunluk ve genişlikleri kıyaslandığında; testis uzunlukları 2., 3. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı derecede azalmıştır ($P=0.014$, $P=0.007$, $P=0.007$). Testis genişlikleri karşılaştırıldığında ise sadece 2. grupta, 1. gruba göre anlamlı bir azalma saptanmıştır ($P=0.006$).
5. İkinci, 3. ve 4. grupların seminifer tübül çapları; 1. grup ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma bulunmuştur (sırasıyla $P=0.009$, $P=0.006$, $P=0.009$). İkinci ile 3. grup

değerleri karşılaştırıldığında ise 3. grupta, 2. gruba göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P=0.006$). Ancak 2. ve 4. grupların değerleri arasında anlamlı herhangi bir fark bulunmamıştır.

6. Bazal membran kalınlıkları; 2. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı olarak artarken ($P=0.028$, $P=0.011$), 3. grup ile 1. grubun bazal membran kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P=0.855$). 3. ve 4. grupların bazal membran kalınlıkları, 2. gruba göre anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla $P=0.015$, $P=0.032$).
7. Tüm deney gruplarından elde edilen ortalama Johnsen skor değerleri; 1. grup ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (tüm gruplar için $P<0.05$). İkinci grup ile 3. ve 4. gruplar karşılaştırıldığında ise 3. ve 4. gruplardaki deneklerimizin Johnsen skor değerlerinin, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($P=0.003$, $P=0.003$). Fukoidanın farklı zamanlarda uygulandığı gruplar arasında, istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir ($P=0.198$).
8. Apoptotik tübül indekslerinin ise; 1. gruba göre, 2., 3. ve 4. gruplarda anlamlı derecede artarken (sırasıyla $P=0.008$, $P=0.006$, $P=0.008$); 3. ve 4. grupların değerlerinde, 2. gruba göre istatistiksel bir azalma tespit edilmiştir (sırasıyla $P=0.035$, $P=0.009$). Fukoidan uygulanan gruplar arasında ise apoptotik tübül indeksi açısından fark bulunmamıştır ($P=0.408$).
9. Apoptotik hücre indeksi sonuçları, gruplar arasında kıyaslandığında ise 1. gruba göre, tüm gruplarda artış izlenirken ($P<0.05$); fukoidan verilen 3. ve 4. gruplardaki değerler, 2. grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla $P=0.006$, $P=0.008$) gözlenmiştir. Apoptotik hücre indeksi değerlerinde, 3. ve 4. gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P=0.513$).

ÖZET

Bu çalışmada; güçlü bir antioksidan olan fukoidanın, diyabet ile birlikte ortaya çıkan hiperglisemi ve oksidatif strese karşı, diyabetik erkek infertilite tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Yirmi dört adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçan kullanılarak; 1.grup: Kontrol grubu (n=6), 2.grup: Diyabet grubu; 40 mg/kg STZ, 5 ardışık gün ip. (n=6), 3.grup: 40 mg/kg STZ+50 mg/kg ip. fukoidan (Son STZ enjeksiyonundan sonra, 6 hafta boyunca, güneşirı, n=6), 4.grup: 40 mg/kg STZ+50 mg/kg ip. fukoidan (diyabet oluşturulduktan 15 gün sonra, 6 hafta süresince, güneşirı, n=6) olmak üzere gruplar oluşturulmuştur.

Kan glukoz düzeyleri; 1. gruba göre, diğer tüm gruplarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Seminifer tübül çapları ise 1. grup ile kıyaslandığında, diğer gruplarda anlamlı olarak azalırken ($P=0.009$, $P=0.006$, $P=0.009$); 3. grupta ise 2. gruba göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P=0.006$).

Bazal membran kalınlıkları; 2. ve 4. gruplarda, 1. gruba göre anlamlı olarak artarken ($P=0.028$, $P=0.011$), 3. ile 1. grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P=0.855$). Üçüncü ve 4. grupların bazal membran kalınlıkları, 2. gruba göre istatistiksel anlamlılıkla azalmıştır (sırasıyla $P=0.015$, $P=0.032$).

Johnsen skoru sonuçları; tüm gruplar, 1. grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalırken ($P<0.05$); 2. gruba göre, 3. ve 4. gruplarda istatistiksel anlamlılıkla artmıştır ($P=0.003$, $P=0.003$).

Apoptotik tübül ve hücre indeksi; 1. gruba göre 2., 3. ve 4. gruplarda anlamlı derecede artarken ($P=0.008$, $P=0.006$, $P=0.008$), 3. ve 4. grupların değerlerinde 2. gruba göre istatistiksel bir azalma tespit edilmiştir (sırasıyla $P=0.035$, $P=0.009$).

Sonuç olarak; diyabetin neden olduğu erkek infertilite olgularında, fukoidanın koruyucu etki gsterebileceği kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, Testis, Apoptozis, Fukoidan



INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF FUCOIDAN IN TESTICULAR TISSUES OF DIABETIC RATS

SUMMARY

In this study, fucoidan which is a powerful antioxidant has investigated availability on treatment of diabetic male infertility.

Twenty four *Wistar albino* rats were divided into four groups; 1.group: Control group, 2.group: 40 mg/kg STZ, ip., 5 consecutive days), 3.group: 40 mg/kg STZ+50 mg/kg fucoidan ip. (after the last STZ injection, every other day, during six weeks), 4.group: 40 mg/kg STZ+50 mg/kg fucoidan ip. (after fifteen days induction of diabetes, every other day during six weeks).

The seminiferous tubules diameters has been significantly decreased in other groups ($P=0.009$, $P=0.006$, $P=0.009$) compared with the 1st group; in the 3rd groups values has been significantly increased compared with the 2nd group ($P=0.006$).

The thickness of basement membrane has been statistically increased in the 2nd and 4th groups when compared with 1st group ($P=0.028$, $P=0.011$), no significant difference has been detected between 3rd and 1st groups ($P=0.855$). In the 3rd and 4th groups values were significantly decreased compared to 2nd group ($P=0.015$, $P=0.032$, respectively).

Johnsen score values were significantly decreased in all groups compared with 1st group ($P<0.05$). There were significantly increased in 3rd and 4th groups compared to 2nd group.

Apoptotic tubule and cell indices in the experiment groups were significantly increased compared to 1st group ($P=0.008$, $P=0.006$, $P=0.008$, respectively). It was statistically reduced in the 3rd and 4th groups compared with the 2nd group.

As a result of this study, we think fucoidan may show a protective effect in the infertility cases caused by diabetes.

Keywords: Diabetes mellitus, Testes, Apoptosis, Fucoidan



KAYNAKLAR

1. Gobbo MG, Costa CF, Silva DG, de Almeida EA, Goes RM. Effect of melatonin intake on oxidative stress biomarkers in male reproductive organs of rats under experimental diabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:614579.
2. <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>. 15.04.2016 tarihinde erişildi.
3. Xiang L, Mittwede PN, Clemmer JS. Glucose homeostasis and cardiovascular alterations in diabetes. *Compr Physiol* 2015;5(4):1815-39.
4. <http://www.saglik.gov.tr/HM/dosya/1-71375/h/turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-p%20rogrami.pdf>. 20.04.2016 tarihinde erişildi.
5. Ghanbari E, Nejati V, Najafi G, Khazaei M, Babaei M. Study on the effect of Royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Fertil Steril* 2015;9(1):113-20.
6. Orman D, Vardi N, Ates B, Taslidere E, Elbe H. Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubules damage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tissue Cell* 2015;47(3):284-90.
7. Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev* 2008;4(1):46-54.
8. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(5):626-35.
9. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 2012;33(2):145-53.
10. Ferreira C, Sousa M, Rabaca A, Oliveira PF, Alves MG, Sa R. Impact of metformin on male reproduction. *Curr Pharm Des* 2015;21(25):3621-33.
11. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 2014;10(3):147-57.

12. Howland BE, Zebrowski EJ. Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. *Horm Metab Res* 1976;8(6):465-9.
13. Schoeller EL, Schon S, Moley KH. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. *Cell Tissue Res* 2012;349(3):839-47.
14. Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, Sakly M. Protective effect of *lavandula stoechas* and *rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J Med Food* 2015;18(2):241-9.
15. Belviranlı M, Gokbel H, Okudan N, Buyukbas S. Effects of grape seed extract on oxidative stress and antioxidant defense markers in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Med Sci* 2015;45(3):489-95.
16. Mushtaq N, Schmatz R, Ahmed M, Pereira LB, da Costa P, Reichert KP, et al. Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2015;71(4):743-51.
17. Mansouri E, Khorsandi L, Abdollahzade Fard A. Protective role of grape seed proanthocyanidin antioxidant properties on heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Res Forum* 2015;6(2):119-24.
18. Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi S, Nejati V. Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed* 2013;3(4):347-55.
19. Wang J, Liu H, Li N, Zhang Q, Zhang H. The protective effect of fucoidan in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Mar Drugs* 2014;12(6):3292-306.
20. Xue M, Ge Y, Zhang J, Liu Y, Wang Q, Hou L, et al. Fucoidan inhibited 4T1 mouse breast cancer cell growth in vivo and in vitro via downregulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Nutr Cancer* 2013;65(3):460-8.
21. Raghavendran HR, Srinivasan P, Rekha S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. *Int Immunopharmacol* 2011;11(2):157-63.
22. Park HY, Han MH, Park C, Jin CY, Kim GY, Choi IW, et al. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF-kappaB, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Toxicol* 2011;49(8):1745-52.
23. Kim KJ, Yoon KY, Lee BY. Fucoidan regulate blood glucose homeostasis in C57BL/KSJ m+/+db and C57BL/KSJ db/db mice. *Fitoterapia* 2012;83(6):1105-9.
24. American Diabetes A. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:8-16.
25. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204874/1/WHO_NMH_NVI_16.3_eng.pdf?ua=1. 27.04.2016 tarihinde erişildi.
26. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28(12):1039-57.

27. Mallidis C, Green BD, Rogers D, Agbaje IM, Hollis J, Migaud M, et al. Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Int J Androl* 2009;32(2):156-65.
28. Eisenbarth GS. Insulin autoimmunity: immunogenetics/immunopathogenesis of type 1A diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:109-18.
29. Towns R, Pietropaolo M. GAD65 autoantibodies and its role as biomarker of type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Drugs Future* 2011;36(11):847-54.
30. Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocr J* 2012;59(7):531-7.
31. Borg H, Fernlund P, Sundkvist G. Protein tyrosine phosphatase-like protein IA2-antibodies plus glutamic acid decarboxylase 65 antibodies (GADA) indicates autoimmunity as frequently as islet cell antibodies assay in children with recently diagnosed diabetes mellitus. *Clin Chem* 1997;43(12):2358-63.
32. Karakurt F, Çarlıoğlu A, Kasapoğlu B, Gümüş İİ. Gestasyonel diabetes mellitus tanı ve tedavisi. *Yeni Tıp Derg* 2009;26:134-8.
33. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005;115(3):485-91.
34. Aktun LH, Yorgunlar B, Karaca N, Akpak YK. Predictive risk factors in the treatment of gestational diabetes mellitus. *Clin Med Insights Womens Health* 2015;8:25-8.
35. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. *Türk Jem* 2012;16:34-40.
36. <https://www.nobelprize.org/educational/medicine/insulin/discovery-insulin.html> 26.05.2016 tarihinde erişildi.
37. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005;22(4):359-70.
38. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 2009;23(2):245-58.
39. İrer SV, Alper G. Deneysel Diyabet Modelleri. *T Klin Biyokimya Derg* 2004;2(3):127-36.
40. Bell RH, Jr., Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 1983;35(5):433-60.
41. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50(6):537-46.
42. Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fak Derg* 1995;3(2):11-7.
43. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk J Biochem* 2006;31(2):51-6.
44. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):481-93.

45. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008;14(3):243-58.
46. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9(4):169-76.
47. Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Müh Derg* 2003;16:32-7.
48. Noctor G, Lelarge-Trouverie C, Mhamdi A. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 2015;112:33-53.
49. Conrad M, Ingold I, Buday K, Kobayashi S, Angeli JP. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2015;1850(8):1566-74.
50. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep* 2004;9(3):145-52.
51. Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2011;158(6):369-84.
52. Koca C, Altan N, Dinçel AS, Kosova F, Şahin D, Arslan M. Tip 1 ve tip 2 diyabetik hasta serumlarında oksidatif stres ve leptin düzeylerinin incelenmesi. *T Klin Biyokimya Derg* 2008;6(3):99-107.
53. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J Sports Sci Med* 2002;1(1):1-14.
54. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(1):24-38.
55. Van Reyk DM, Gillies MC, Davies MJ. The retina: oxidative stress and diabetes. *Redox Rep* 2003;8(4):187-92.
56. Mezzetti A, Cipollone F, Cuccurullo F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res* 2000;47(3):475-88.
57. Mohasseb M, Ebied S, Yehia MA, Hussein N. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2011;67(2):185-94.
58. Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel anatomi. Ankara: Metu press;2002. s.322-4.
59. Gökmen FG. Sistematik Anatomi. İzmir: İzmir Güven Kitabevi;2003. s.549-51.
60. Sadler TW. Langman medikal embriyoloji (çeviri: AC. Başaklar). Ürogenital sistem. Ankara: Palme Yayıncılık;2011. s.246-8.
61. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Dalçık H, Yıldırım M. (Editörler). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2009. s.175-8.

62. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. Erkek üreme sistemi. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi;2009. s.253-64.
63. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B. (Editör). Erkek üreme sistemi. İstanbul: Palme Yayıncılık;2013. s.784-829.
64. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji Text and Atlas. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Editörler). Erkek üreme sistemi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2009. s.418-33.
65. <http://www.lisebiyoloji.com/ureme.html>. 26.05.2016 tarihinde erişildi.
66. Malavige LS, Jayaratne SD, Kathriarachchi ST, Sivayogan S, Fernando DJ, Levy JC. Erectile dysfunction among men with diabetes is strongly associated with premature ejaculation and reduced libido. *J Sex Med* 2008;5(9):2125-34.
67. Salama N. Sexual dysfunctions as self-reported by diabetic- type-2 men: an andrology clinic-based study in Alexandria, Egypt. *Am J Med Biol Research* 2013;1(3):50-7.
68. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002;22:173-8.
69. Trindade AA, Simoes AC, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT. Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras* 2013;28(4):256-65.
70. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the Sertoli and Leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(1):623-35.
71. Altay B, Cetinkalp S, Doganavsargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril* 2003;80 Suppl 2:828-31.
72. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007;22(7):1871-7.
73. Anderson JE, Thliveris JA. Testicular histology in streptozotocin-induced diabetes. *Anat Rec* 1986;214(4):378-82.
74. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar Drugs* 2011;9(10):2106-30.
75. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* 2008;13(8):1671-95.
76. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 2010;46(1):6-12.

77. Mandal P, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antivir Chem Chemother* 2007;18(3):153-62.
78. Fitton JH, Stringer DN, Karpiniec SS. Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs* 2015;13(9):5920-46.
79. Li N, Zhang Q, Song J. Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2005;43(3):421-6.
80. Chung HJ, Jeun J, Hounng SJ, Jun HJ, Kweon DK, Lee SJ. Toxicological evaluation of fucoidan from *Undaria pinnatifidain vitro* and *in vivo*. *Phytother Res* 2010;24(7):1078-83.
81. Myers SP, O'Connor J, Fitton JH, Brooks L, Rolfe M, Connellan P, et al. A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. *Biologics* 2010;4:33-44.
82. Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Exp Hematol* 2007;35(6):989-94.
83. Fitton JH. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar Drugs* 2011;9(10):1731-60.
84. Huang CY, Wu SJ, Yang WN, Kuan AW, Chen CY. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. *Food Chem* 2016;197:1121-9.
85. Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM, Ferreira da Silva FR, Oliveira Rocha HA, Leite EL. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol* 2007;19(2):153-60.
86. Zaragoza MC, Lopez D, M PS, Poquet M, Perez J, Puig-Parellada P, et al. Toxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J Agric Food Chem* 2008;56(17):7773-80.
87. Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucoidan from *Sargassum sp.* and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. *Int J Biol Macromol* 2011;49(3):331-6.
88. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1(1):2-25.
89. Mirilas P, Psalla D, Mentessidou A. A diagnostic model for histologic damage in undescended testes based on testis rigidity measurement: an experimental study with a novel device. *J Surg Res* 2014;192(2):521-30.
90. Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M, Uzal MC. Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Arch Toxicol* 2009;83(8):735-46.

91. Eid NA, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y. Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int J Androl* 2002;25(3):159-67.
92. Lee MW, Kwon JE, Lee YJ, Jeong YJ, Kim I, Cho YM, et al. Prunus mume leaf extract lowers blood glucose level in diabetic mice. *Pharm Biol* 2016:1-6.
93. Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF-beta1, IL-1beta and Akt signalling. *Cell Biochem Funct* 2014;32(1):115-24.
94. Donmez YB, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Acta Cir Bras* 2014;29(10):644-50.
95. Kushwaha S, Jena GB. Telmisartan ameliorates germ cell toxicity in the STZ-induced diabetic rat: studies on possible molecular mechanisms. *Mutat Res* 2013;755(1):11-23.
96. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 2006;66(9):2056-67.
97. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008;40(4):354-60.
98. Zhang W, Wang Y, Yang Z, Qiu J, Ma J, Zhao Z, et al. Antioxidant treatment with quercetin ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biosci Bioeng* 2011;112(3):215-8.
99. Sadik NA, El-Seweidy MM, Shaker OG. The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cell Physiol Biochem* 2011;28(5):887-98.
100. Kim KJ, Lee OH, Lee HH, Lee BY. A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the Sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2010;267(1-3):154-8.
101. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci* 2007;81(13):1079-84.
102. Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. *Peptides* 2015;63:47-54.
103. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol* 2007;23(4):578-87.
104. Bal R, Turk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Ozercan I, Kuloglu T, et al. Protective effects of nanostructures of hydrated C(60) fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology* 2011;282(3):69-81.

105. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, et al. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor Beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers* 2014;2014:108106.
106. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec* 1985;213(1):53-62.
107. Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Koukos S, Shimizu S, Satoh K, et al. Antioxidant treatment with edaravone or taurine ameliorates diabetes-induced testicular dysfunction in the rat. *Mol Cell Biochem* 2012;369(1-2):195-204.
108. Chen S, Zhu Y, Liu Z, Gao Z, Li B, Zhang D, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates diabetic bladder dysfunction via the activation of the Nrf2 pathway. *PLoS One* 2015;10(5):e0126457.
109. Oyenih O, Brooks NL, Oguntibeju OO. Effects of kolaviron on hepatic oxidative stress in streptozotocin induced diabetes. *BMC Complement Altern Med* 2015;15:236.
110. Bayram S, Kizilay G, Topcu-Tarlacalisir Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis. *Biotech Histochem* 2016;91(3):204-11.
111. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *J Vet Med Sci* 2007;69(9):969-71.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 1. Spermatogenez	10
Şekil 2. Birinci grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X200.	23
Şekil 3. Birinci grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X400.	23
Şekil 4. Birinci grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X200.	24
Şekil 5. Birinci grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X400.	25
Şekil 6. İkinci grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X200	26
Şekil 7. İkinci grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X400	26
Şekil 8. İkinci grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X400	27
Şekil 9. İkinci grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X200	28
Şekil 10. İkinci grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X400	28
Şekil 11. Üçüncü grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X200	29
Şekil 12. Üçüncü grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X400	30
Şekil 13. Üçüncü grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X200	31
Şekil 14. Üçüncü grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X400	31
Şekil 15. Dördüncü grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X200	32
Şekil 16. Dördüncü grup testis mikrofafi, H-E boyaması, X400	33
Şekil 17. Dördüncü grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X200	34
Şekil 18. Dördüncü grup testis mikrofafi, PAS-HI boyaması, X400	34
Şekil 19. Birinci gruba ait TUNEL mikrofafaları, hematoksilen zıt boyaması, X100	36
Şekil 20. Birinci gruba ait TUNEL mikrofafaları, hematoksilen zıt boyaması, X200	36
Şekil 21. İkinci gruba ait TUNEL mikrofafaları, hematoksilen zıt boyaması, X100	37

Şekil 22. İkinci gruba ait TUNEL mikrografları, hematoxilen zıt boyaması, X200	38
Şekil 23. Üçüncü gruba ait TUNEL mikrografları, hematoxilen zıt boyaması, X100	38
Şekil 24. Üçüncü gruba ait TUNEL mikrografları, hematoxilen zıt boyaması, X200	39
Şekil 25. Dördüncü gruba ait TUNEL mikrografları, hematoxilen zıt boyaması, X100.....	39
Şekil 26. Dördüncü gruba ait TUNEL mikrografları, hematoxilen zıt boyaması, X200.....	40

TABLolar

Tablo 1. Çeşitli türlerde bulunan fukoidan içerikleri.....	12
Tablo 2. Çeşitli türlerde bulunan fukoidanın moleküler ağırlıkları	13
Tablo 3. Johnsen skorlaması.....	16
Tablo 4. Kan glukoz düzeyi, vücut ve testis ağırlık değerleri	20
Tablo 5. Testis uzunluk ve genişlik, seminifer tübül çapı ve bazal membran kalınlık ölçümleri.....	21
Tablo 6. Johnsen skorlaması değerleri.....	22

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kırklareli ilinin Lüleburgaz ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğretimini Edirne’de tamamladıktan sonra, 2007 yılında başladığı Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı’nda, yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

EKLER



Ek-1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/02

Karar Tarihi: 31.01.2014

KARAR NO: 2014.02.03

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Gülnur KIZILAY'ın yaptığı, Onur ERSOY'un Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/04 protokol nolu "Diyabetik sıçanların testis dokularında fukoidan etkilerinin araştırılması" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	