

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
2. Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARIN TESTİS DOKULARINDA JNK VE IL-6
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ

Referans no: 10067776

EDİRNE – 2015

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
2. Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARIN TESTİS DOKULARINDA JNK VE IL-6
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2013/25

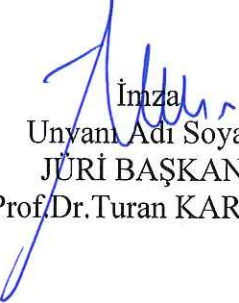
Tez No:


EDİRNE – 2015


T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY


Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde, Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN ve Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA danışmanlığında doktora öğrencisi Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ tarafından tez başlığı “Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanların Testis Dokularında JNK ve IL-6 İlişkisinin İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 06/03/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Doktora Tezi**” olarak kabul edilmiştir.


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


İmza
Unvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Tunç KUTOĞLU


İmza
Unvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK


İmza
Unvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN


İmza
Unvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tamam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Eğitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan sevgili aileme minnettarım. Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalıŐmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen, başta tez danıŐman hocalarım Doç. Dr. Gölner KIZILAY ÖZFİDAN ve Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Turan KARACA, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR ve Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve çalıŐmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma en içten teŐekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalıŐmama maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teŐekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
DIABETES MELLİTUS	4
STREPTOZOTOSİN VE DENEYSEL DİYABET MODELLERİ	7
DİYABET VE İNFERTİLİTE	9
MİTOJENLERİN AKTİVE ETTİĞİ PROTEİN KİNAZLAR	11
SİTOKİNLER	14
DİYABET, JNK ve IL-6 İLİŞKİSİ	16
GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
BULGULAR	26
TARTIŞMA	59
SONUÇ	70
ÖZET	72
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	76
ŞEKİLLER LİSTESİ	85
ÖZGEÇMİŞ	88
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AP-1	: Aktivatör protein 1
β	: Beta
DM	: Diabetes mellitus
ERK	: Ekstracellular signal-regulated kinase
FSH	: Foliküler stimulan hormon
HSCORE	: Histolojik skorlama
H+E	: Hematoksilen+Eozin
IL	: İnterlökin
JNK	: c-Jun NH2-terminal kinase
LH	: Lüteizan hormon
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MKK	: Mitogen-activated protein kinase kinase
PAS	: Periodic asit shciff
ROS	: Reactive oxygen species
STZ	: Streptozotosin
TBS	: Tris buffer saline
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet (Diabetes mellitus; DM); insülin salgılanması ya da insülin kullanımındaki yetersizlikle ortaya çıkan kronik hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozukluğa sebep olan sistemik bir hastalıktır (1-3).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından sunulan raporda, 2009 yılında dünyada 285 milyon kişinin diyabetten etkilendiği ortaya koyulmuş olup, bu sayının 2030 yılında yaklaşık 438 milyon kişiyi bulacağı bildirilmiştir (1,2). Uluslararası Diyabet Federasyonunun öngörüsü ise bu sayının daha da fazla olacağı yönündedir (3).

Diyabet insidansı ve prevalansı; insanların yaşam sürelerinin uzaması, fiziksel aktivitelerinin azalması ve obezitenin yaygınlaşmasıyla, tüm dünyada gittikçe artan bir eğilim göstermektedir. DM, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olmasıyla, ölüme neden olan ilk beş hastalık içerisinde yer almaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık 4.6 milyon insanın DM sebebiyle öldüğü bildirilmektedir (4-7).

Diyabet başlıca semptomları polidipsi, polifaji ve poliüri olan, en çok bilinen komplikasyonları arasında ise nefropati, nöropati, retinopati, anjiyopati ve periferik damar hastalıklarının sayılabildiği, tüm bu semptom ve komplikasyonları nedeniyle tedavi maliyeti oldukça yüksek olan bir halk sağlığı problemidir (2,8,9).

Bilinen bu komplikasyonlarının yanısıra, son yıllarda özellikle diyabetik erkeklerde; libido azalması, erektil disfonksiyon ve retrograd ejakulasyon gibi seksüel fonksiyonel bozukluklar da diyabetin önemli komplikasyonları arasında yerini almaktadır (7,10-12). Diyabetik erkek hastalarda subfertilite ve infertilite prevalanslarının yüksek olması, oldukça dikkati çekmektedir (13,14).

Diyabet nedeniyle erkek bireylerde ortaya çıkan bu olumsuzluklar; araştırmacıları deneysel diyabet modellerinin kullanımıyla, bu konunun bilinmeyenlerini çözmeye sevk etmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar, her geçen gün artmaktadır (15-19). Diyabetik erkeklerin testis dokularında, özellikle hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde ortaya çıkan düzensizlik sonucunda, testosteron düzeylerinin düşmesi ve apoptozisin de katkısıyla, histopatolojik değişiklikler ve anormal spermatogenezin meydana geldiği bilinmektedir (7,10,11,17,19,20).

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz'lar (MAPK); embriyogenezis, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü ile ilgili çeşitli sinyallerin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir protein grubunu oluşturmaktadır. Çok hücreli organizmalarda MAPK'lar; c-Jun N-terminal kinaz (JNK veya SAPK), p38 MAPK ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK)'lar olarak 3 alt gruba ayrılmaktadır. JNK; strese karşı cevabıyla dikkati çekmekte ve özellikle dokularda herhangi bir nedenle ortaya çıkan artmış apoptozisde önemli roller üstlenmektedir (21,22). Diyabetik sıçanların testis dokularında JNK ekspresyonunun arttığı, bugüne kadar yapılan birkaç çalışmada tespit edilmiştir (22,23).

Sitokinler; hücreler arasındaki iletişimi sağlayan, akut faz yanıt, hematopoez, immünite, anjiyogenez ve inflamasyonda rol oynayan multifonksiyonel proteinlerdir (24,25). Sitokinler; interlökin (IL)'ler, interferonlar, koloni stimule edici faktörler ve tümör nekroz faktör (TNF)'ler olarak gruplandırılmışlardır (27). İnflamasyonda önemli rol oynayanlar arasında ise; IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 ve TNF sayılabilir (25-27).

Kronik ve sistemik bir hastalık olan diyabetin komplikasyonlarında, IL-6'nın doku inflamasyonu ve dejenerasyonu açısından düzenleyici bir etkisi olduğu bilinmektedir. Diyabette, IL-6 ve yüksek kan glukozunun sergiledikleri karşılıklı sinerjik etkide, JNK yolağının aracılık ettiği düşünölmektedir (24).

Yaptığımız araştırmalar sonucunda, böylesine sıkı ilişkide olan JNK ve IL-6'nın, diyabetik testis dokusundaki ilişkilerini inceleyen literatüre rastlanılmamıştır. Bu çalışmayla; diyabetik erkek sıçanlarda, JNK inhibisyonu ya da inhibisyon olmaksızın, JNK ve IL-6 arasındaki ilişkiyi gözlemleyerek, özellikle diyabetli erkek bireylerde subfertilite ve infertilite tedavisine yönelik yeni bir bakış açısı getirmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus; kalıtım ve çevresel faktörlerin etkisi sonucunda meydana gelen, pankreasın insülin sekresyonu yetersizliği veya dokuların insüline duyarsızlığı sonucu, insülin kullanımının tam veya kısmi yetersizliğiyle ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Yüzyıllardır bilinen bir hastalık olmasına rağmen, etiyoloji ve patolojisinde hala karanlık noktalar barındırmaktadır (1,11,28).

Diyabet Amerika'da en sık görülen hastalıklardan biridir. Nüfusun büyük kısmının aşırı kilolu ya da obez olduğu Amerika'da, bu bireylerin yaklaşık % 40'ının diyabetik olduğu tespit edilmiştir (29). Ülkemizde ise Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması (TURDEP)'nin sonuçlarına göre 2001 yılında %7 olarak tespit edilen diyabet prevalansı (30), Diyabet Cemiyeti tarafından 2013 yılında yayınlanan raporda, %15 olarak bildirilmektedir (31). Son on yılda izlenen bu artış, oldukça dikkat çekici ve önemli görünmektedir.

Amerikan Diyabet Birliği tarafından 2014'te yeniden belirlenen tanı kriterlerine göre; poliüri, polidipsi, glukozüri, ketonüri ve açıklanamayan ağırlık kaybı gibi semptomlar ile birlikte, herhangi bir zamanda ölçülen plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dL bulunması veya 10-12 saat açlık sonu, sabah kan glukozunun ≥ 100 mg/dL veya iki kez ≥ 126 mg/dL bulunması DM olarak

tanımlanmaktadır. Ayrıca 75 gr glukoz ile yapılan "oral glukoz tolerans testi"nde, 2. saatteki glukozun ≥ 200 mg/dL olması ile DM tanısı konmaktadır (1).

Endüstriyel ülkelerde sıklığı artan DM, yüksek oranda hedef organ hasarlarına yol açmaktadır (32). DM'nin hedef organları arasında; kalp ve kan damarları, gözler, böbrekler, sinirler ve testisler yer almaktadır. Uzun dönemde bu organlarda meydana gelen hasarlar, disfonksiyon ve yetmezlik, morbidite ve mortalite önemli yer tutmaktadır (1,8,18,19).

Diabetes Mellitus Sınıflandırması

Diabetes Mellitus'un sınıflandırması ilk olarak 1979'da Diyabet Veri Grubu tarafından yapılmıştır (33). Amerikan Diyabet Birliği ile birlikte, 2014 yılında tekrar gözden geçirilmiş ve son halini almıştır. Buna göre diyabet; tip 1, tip 2, gestasyonel ve diğer spesifik tipler olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (1).

I. Tip 1 diyabet:

Tip 1 diyabetin en sık nedeni (olguların % 90'dan fazlası); pankreas beta (β) hücrelerinin, T hücre aracılı otoimmün yıkımıdır. Bununla birlikte, etiyojisi hala tam olarak anlaşılamamıştır (1,32). Tüm diyabetiklerin yaklaşık %5-10'unu, tip 1 DM'li hastalar oluşturur. Her yaşta görülmekle beraber, daha çok çocuklukta ve adolesan yaşta başlar. Bu tip diyabet, genetik yatkınlık ve çevresel etkenlere bağlı olarak gelişirken, mutlaka insüline bağımlı olarak bilinmektedir (1,32,34).

Çoğunlukla otoimmün (tip 1A) ve idiyopatik (tip 1B) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Tip 1A'da pankreas β hücrelerinin çeşitli bileşenlerine karşı otoantikolar bulunurken, tip 1B'de otoimmünite bulguları yoktur ve kanda insülin düzeyleri düşük seyretmektedir (34).

II. Tip 2 diyabet:

Tip 2 diyabetli bireylerde; pankreas β hücrelerindeki fonksiyon bozukluğu sonucunda, insülin direnci ve/veya bozulmuş insülin sekresyonu gelişmektedir (1, 28,32,35). Dünyada en sık rastlanılan diyabet tipi olup, tüm diyabetlilerin yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır (1).

Genellikle 40-45 yaşından sonra görülürken, yaş arttıkça görülme sıklığı da artmaktadır. Başlangıçta diyabet semptomları hafif şiddette görülebilir, hatta bazen hiç görülmemektedir. Semptomsuz dönemi takiben, poliüri, polidipsi, kilo kaybı gibi klasik DM semptomları ortaya çıkmaktadır. Birçok hasta ise tesadüfen bulunan hiperglisemi veya glukozüri ile tanı almaktadır. Diyabetin kronik hiperglisemisi, uzun dönem komplikasyonları ile yakından ilişkilidir (1-3).

Glukoz dengesi gözönüne alındığında, klinik açıdan belirgin olan tip 2 diyabet, tipik olarak aşağıdaki sıra ile gelişen ve hastalık sürecinin farklı evrelerini temsil etmesi olası, üç olayla karakterizedir ki bunlar;

1- İnsülin duyarlılığında azalma veya insülin direnci,

2-Göreceli insülin yetersizliği ile birlikte, pankreas β hücrelerinde fonksiyon bozukluğu,

3-Karaciğerde glukoz üretiminde artış olarak belirtilebilmektedir (36).

Tip 2 DM hastalarında, insülin direnci genel bir bulgudur. Belirgin hipergliseminin gelişmesinden önce ortaya çıkmaktadır. Hiperglisemi sonucunda, bozulmuş insülin işlevini telafi edebilmek için, pankreastan insülin sekresyonu artmaktadır. Kompansatuar hiperinsülinemi; glukoz seviyesini normal düzeyde tutar, ancak diyabet geliştirmeye eğilimli vakalarda, β hücresinin devamlı uyarılması, hücre fonksiyonunda bozukluğa yol açar ve β hücrelerinin aktivitesi azalır; bu durum hiperglisemik diyabet evresini tanımlamaktadır (28,36).

İnsülin, hepatik glukoz yapımını baskılayarak ve iskelet kasında glukoz kullanımını uyararak, kan glukozunu düşürmektedir (37). Hipergliseminin gelişmesi, β hücre sekresyonunu stimüle eder ve ortaya çıkan hiperinsülinemi, insülin reseptör sayısını azaltıp, insülinin etkilerini bozarak, insülin direncini daha da artırmaktadır (28,37).

Hiperglisemide, glikolizasyon son ürünleri ile reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumu artmakta, bu da protein kinaz C yolunun fizyolojik aktivatörünün

oluşumuyla sonlanmaktadır. Protein kinaz C aktivasyonu, kollajen ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks proteinlerinin ve endotelin benzeri vazoaktif araçların üretiminin artması gibi bir dizi hücrel değişikliklerle sonuçlanmaktadır. Hücrel düzeydeki bu değişikliklerin sonucunda; bazal membran kalınlaşması, vasküler geçirgenlik ve/veya kan akımında değişiklikler meydana gelmektedir (38).

Tip 2 diyabette, akut faz yanıtta etkili olan akut faz proteinlerinin ve aracı sitokin IL-6'nın ekspresyonunun da arttığı bildirilmektedir (24,28).

III. Gestasyonel diyabet

Gebelik sırasında ilk kez ortaya çıkan DM türü olarak bilinmektedir. Gebelikte karbonhidrat metabolizmasına etki eden birçok faktör tarafından ortaya çıktığı düşünülmektedir. Gebelik yaşının fazlalığı (>25 yaş), ailede diyabetli öyküsü olması, gebelik öncesi kilo fazlalığı, önceki gebeliklerinde gestasyonel diyabet veya glukoz toleransı bozukluğu tanısı alması, gestasyonel diyabet riskini arttıran faktörlerdir. Tüm gebeliklerin yaklaşık %5-6'sında ortaya çıkmaktadır (1-3).

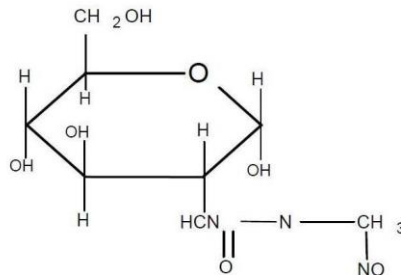
IV. Sekonder diyabet veya spesifik nedenlere bağlı diyabet:

Diyabetle sonuçlanan pek çok klinik durumu kapsamaktadır. İnsülin etki yollarındaki genetik sorunlar, enzimsel pankreas hastalıkları, kimyasal etkenlerin yarattığı β hücre hasarları ve infeksiyonlar gibi durumlar, bu tip diyabete sebep olabilmektedir. Aslında bu tip diyabet, genetik bir defekte sahip olan bireylerde, bu defekt sebebiyle de ortaya çıkabilmektedir. Diyabet hastalarının %1'inden azı, bu tip diyabete sahiptir (1-3).

STREPTOZOTOSİN VE DENEYSEL DİYABET MODELLERİ

Streptozotosin (STZ), (2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) ilk kez 1960 yılında toprakta bulunan *Streptomyces achromogenes* isimli bir mikroorganizmadan izole edilmiş olup, dar spektrumlu bir

antibiyotik olarak kullanılırken, 1963'te köpek, kedi ve ratlarda diyabetojenik etkili bir madde olarak tanımlanmıştır. Şekil 1'de kimyasal yapısı gösterilen, moleküler ağırlığı 265,2 kilodalton (kDa) ve formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ olan kimyasal bir ajandır (39-43). Günümüzde diyabetojenik etkisinden yararlanılmakta ve deneysel diyabet çalışmalarında kullanılmaktadır. Optimum stabilitesi için pH 4–4,5 olmalıdır. Beyaz ve açık sarı arasında değişen renkte, suda ve alkolde kolayca çözünebilen bir maddedir. Dondurulmuş olarak saklanması gerekir, ışıktan ve nemden korunmalıdır (41,43).



Şekil 1. Streptozotocin'in kimyasal yapısı (43)

Streptozotocin; glukoz taşıyıcısı aracılığıyla, pankreas β hücrelerini tahrip etmektedir. Yapısında bulunan bir glukoz molekülü aracılığıyla, plazma membranındaki glukoreseptörlere bağlanır ve hücre içine girerek, toksik etki gösterir ve glukozla bağlı olarak yapılan insülin salınmasını bloke eder (19,39,43). STZ; pankreatik β hücrelerindeki, DNA bazlarında alkilasyona neden olur. Bunu DNA tamiri dönemi izler ve tamir sırasında görev alan polimeraz, hücre içindeki nikotinamid adenin dinükleotid depolarını kullanarak, boşaltıp ve ATP içeriğini azaltmaktadır. Bu durumda hücresel enerji depolarının tüketimi, β hücrelerinde nekroza yol açmaktadır (39,40,43,44).

Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla deney hayvanlarına yapılan STZ uygulaması sonrasında, ortaya çıkan biyokimyasal değişimler, 3 faz halinde incelenebilmektedir. STZ uygulandıktan sonra görülen ilk fazda, kan glukoz değeri ilk 2 saat içinde yükselir. Bu geçici hiperglisemi, karaciğerde glikojenin ani yıkımından dolayıdır ve diyabetojenik ajanı uygulamadan önce hayvan 12-18

saat süreyle aç bırakılırsa, azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Hiperglisemik dönemde, plazma insülin düzeyleri düşüktür (39,40).

İkinci faz yaklaşık 6 saat sonra başlar ve şiddetli hipoglisemi ile karakterizedir. Genellikle diyabetojenik ilaç uygulamasını izleyen ilk 24 saat içindeki ölümlerden, bu aşamadaki hipoglisemi sorumludur ve bu dönemde, hayvana şekerli sıvı verilmesi önerilmektedir. Hipoglisemi, β hücrelerinin ölümüyle birlikte, yüksek miktarda insülin salıverilmesine bağlıdır; bu dönemde plazma insülin düzeyleri çok yükselmektedir (39,40).

Üçüncü faz; STZ enjeksiyonunu takip eden 10-12. saatlerde başlar ve bu dönem hiperglisemik dönemdir. Plazma insülin seviyeleri, artık düşmüştür ve aylarca düşük olarak seyretmektedir (39,40).

DIYABET VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Diyabetin, erkek genital sistemin fonksiyonları üzerindeki etkisi, son yıllarda öne çıkan komplikasyonlardan birini oluşturmaktadır. Diyabetik erkek hastalarda, subfertilite/infertilite olguları oldukça sık görülmektedir (7,11,45). 2009 yılında literatür bilgisine eklenen iki farklı çalışmada, diyabetik erkeklerde subfertilite prevalansının % 51 olduğu, 857 erkek hastanın takip edildiği bir başka çalışmada ise infertilite prevalansının % 35 olduğu ileri sürülmektedir (13,14).

Diyabetik erkeklerde, tübül içi kan akımındaki glukoz seviyesinde meydana gelen dalgalanmalar, spermatogenezin sürekliliğini etkiler. Testis dokusunda bulunan hücreler arasındaki metabolik işbirliği, hormonal kontrol altındadır. DM'nin hipotalamo-hipofiziyal-gonadal eksenini etkileyerek, luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH)'ların salınımındaki kontrol mekanizmalarını değiştirdiği bilinmektedir. Ayrıca spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücrelerinin hem parakrin hem de endokrin kontrolü altındadır. Yani Sertoli hücrelerini etkileyen hormonal dalgalanmalar, spermatogenik seri hücrelerini, özellikle de spermleri olumsuz etkilemektedir. DM'nin spermin nükleer ve mitokondriyal DNA'sında hasar oluşturarak, sperm kalitesini etkilediği ve buna ek olarak, iktidarsızlık ve libido azalması gibi cinsel sorunlardan da sorumlu olduğu

bilinmektedir (11,7). Ejakülasyon problemleri (retrograd ejakülasyon gibi) ve erektil disfonksiyon, diyabetik bireylerde sıkça rastlanan diğer sorunlardır (11).

Kronik hiperglisemi; pankreatik β hücrelerinin fonksiyonlarının bozulmasına ve insülin salınımı için gerekli olan genlerin ekspresyonunun azalmasına neden olarak, insülin biyosentezini ve sekresyonunu bozmaktadır. Bu süreç, "glukoz toksisitesi" olarak adlandırılmaktadır (28,35,46,47). Yüksek glukoz ve yağ asit düzeyi, reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) artışına ve sonucunda da β hücrelerinin dejenerasyonuna neden olmaktadır (28,47,48).

Oksidatif stres, DNA'nın kendini replike etmesini etkileyerek, hücre bölünmesine bir engel teşkil etmektedir. Aynı zamanda genellikle hücreyi apoptozise kadar götüren bir süreci de başlatmaktadır (15). Apoptozis, hasar görmüş dokunun hızlı bir şekilde kendini yıkım sürecidir. Memeli testislerinde germ hücre apoptozisi, normal şartlarda da erkek gametlerin aşırı üretimini kontrol etmektedir (49). ROS üretimi ile birlikte görülen, artmış sperm hasarı ve apoptozis arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (50, 51). Seminal plazma, oksidatif strese karşı spermi korumak için, serbest radikal süpürücüsü olarak fonksiyon gören antioksidanlarla donatılmıştır. Ancak serbest radikallerle, antioksidan sistem arasındaki dengenin, serbest radikal yönündeki artışı, apoptozis ile sonuçlanabilmektedir (52).

Reaktif oksijen ürünlerinin; normalde spermlerde akrozomal reaksiyonu, kapasitasyonu ve dolayısıyla spermin kalitesini etkilediği bilinmektedir. ROS düzeylerindeki değişimler, fertilizasyon sırasında spermin oosite füzyonunu engelleyebilmektedir (50,53).

Diyabetik erkeklerde başta testosteron düzeylerinin düşmesi olmak üzere izlenen tüm biyokimyasal değişiklikler (11,18,22) sonucunda; seminifer tübül atrofi, germinal epitelde düzensizlik ve tübül lümeninde spermatogenik seriye ait hücrelerin bulunması, tübül içi sperm sayısında azalma, apoptozis, seminifer tübüllerde dev hücrelerin görülmesi, bazal membran kalınlığında ve interstisyel alan hacminde artış, vakuolizasyon ve konjesyon gibi bulgular, diyabetik testis dokularında sıkça gözlenen histolojik değişimlerdir (18,50).

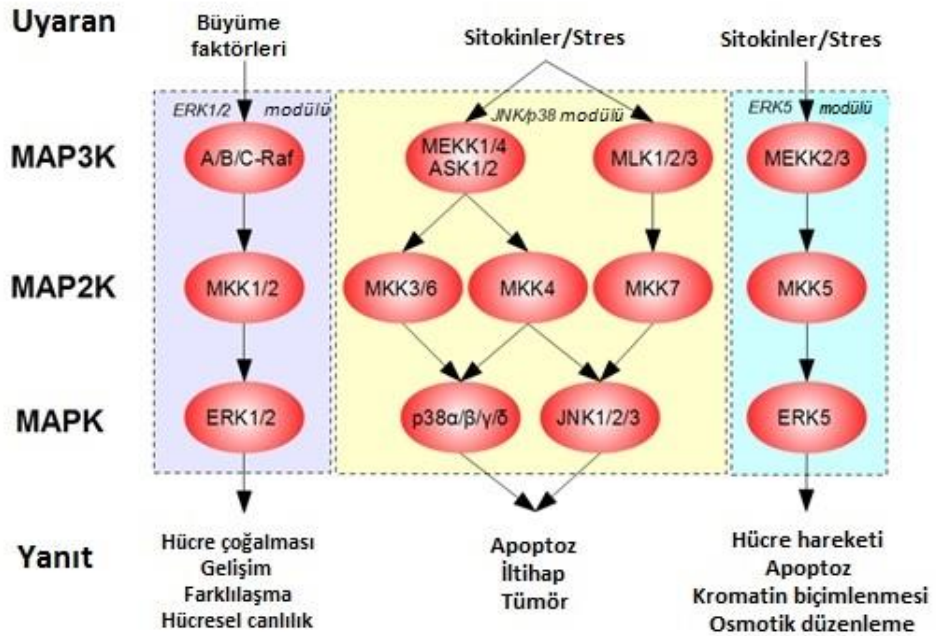
MİTOJENLERİN AKTİVE ETTİĞİ PROTEİN KİNAZLAR

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinazlar, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ve sinyalin, reseptörler vasıtasıyla hücre nükleusuna iletiminden sorumlu olan bir dizi protein kinazlardır. Memeli hücrelerinde MAPK ailesi;

-JNK (JNK1, JNK2 ve JNK3)

-p38-MAPK (p38-MAPK α , p38-MAPK β , p38-MAPK γ , p38-MAPK δ),

-ERK (ERK1 ve ERK2) olmak üzere 3 gruptan oluşmaktadır (Şekil 2; 54-58).



Şekil 2. MAPK sinyal yolağı (55)

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinazlar; embriyogenezis, gen ekspresyonu, proliferasyon, apoptozis ve motiliteyle ilişkili süreçlerin kontrolündeki çeşitli sinyallerin düzenlenmesinde büyük rol oynarlar (57,58). MAPK proteinleri; hücredeki başka proteinlerin serin (Ser) / treonin (Thr)'lerine fosfat ileterek, etkinliklerini kontrol edebilirler (55,59). Membran yerleşimli kinazlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Ayrıca

fosforilasyona uğrayan aminoasit türüne göre de tirozin ve serin / treonin kinazlar olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırmada MAPK'lar, serin / treonin kinazlar arasında bulunmaktadırlar (54).

c-Jun N-terminal kinazlar; DNA hasarı, iskemi, inflamatuvar sitokinler, ısı, stres, radyasyon, oksidatif stres gibi çeşitli hücrel ve çevresel streslere yanıt olarak aktifleşmektedirler (56-58). JNK aktivasyonu, MAP kinaz kinaz (MKK) tarafından aktive edilir (23,55-58). JNK aktivasyonu; MKK4 ve MKK7 tarafından, treonin ve tirozin alanlarının fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. JNK protein kinazları; JNK1, JNK2 ve JNK3 genleri tarafından kodlanır (60-62). Transkripsiyon faktörlerinden aktivatör protein-1 (AP-1), JNK sinyal yolağının tetikleyicisidir. Bir proto-onkogen olan c-jun ise, AP-1 transkripsiyon faktörlerinin bir parçasıdır ve strese yanıtta ve proliferasyonun düzenlenmesinde rolü çok önemlidir. c-jun'un düzenlenme yolu ve buna bağlı olarak AP-1'in aktivitesi, JNK vasıtasıyla c-jun'un N-terminal ucundan fosforilasyonu yoluyla gerçekleşmektedir (59,60,62). JNK; aktifleştiği hücre ve uyarana bağlı olarak, proapoptotik ya da antiapoptotik etkinlik gösterebilir. JNK ile indüklenen apoptoziste, JNK'nın proapoptotik etkinliği, Bcl-2 protein ailesinin ekspresyonuna bağlıdır (60).

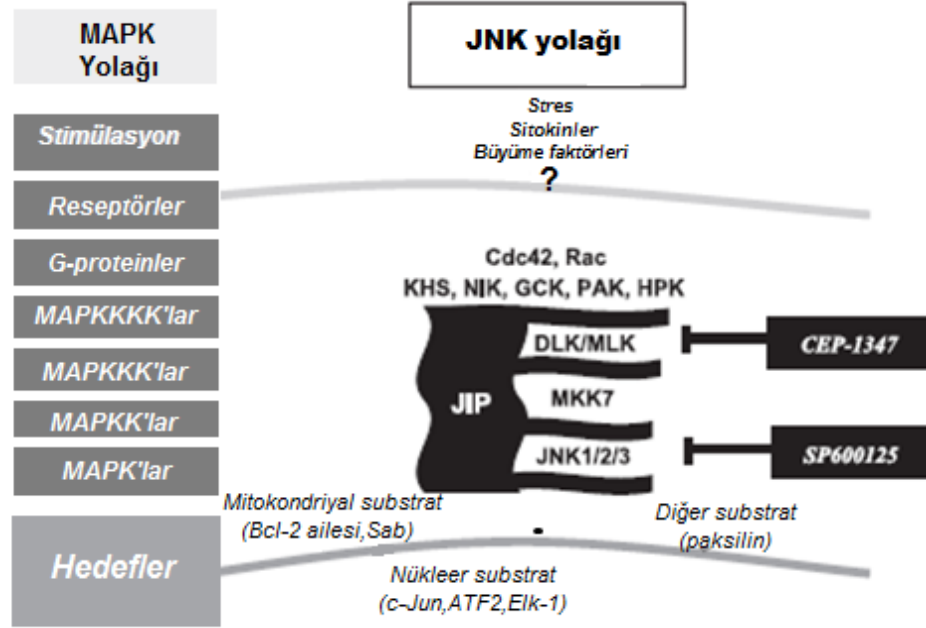
p38 MAPK; apoptoziste ve inflamatuvar cevap oluşmasında önemli rolü olan bir protein kinazdır. Çevresel strese karşı cevap oluşturmasından dolayı "stresin aktive ettiği kinazlar" grubundadır (56,57).

Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar, memeli hücrelerinde ilk tanımlanan MAPK'lardır. ERK aktivasyonu; protein-treonin kinazlar veya G proteinleri-eşlikli reseptörler aracılı büyüme faktörü ile indüklenmektedir. Hücre proliferasyonu ve farklılaşması, hücre göçü ve hücre iskeletinin şekillenmesi gibi hücrel faaliyetlerdeki rolü önemlidir (54,55).

JNK İnhibitörleri

Günümüzde JNK'nın biyolojik fonksiyonlarını araştırmak amacıyla JNK inhibitörlerinin kullanımı yaygındır. JNK yolağı; farklı şekillerde inhibe edilebilmektedir. İnhibisyon; JNK genleri yada genleri kodlayan JNK yolağı

bileşenlerinin seçici olarak tahrip edilmesiyle yapılabileceği gibi, mikst lineage kinaz (MLK) protein kinazların yarı sentetik bir inhibitörü olan CEP-1347 ya da ATP-kompetitif bir inhibitör olan antrapirazolon, SP600125 veya peptit inhibitörler kullanılarak da yapılabilmektedir (Şekil 3; 46,63,64).



Şekil 3. JNK yolağının organizasyonu ve inhibitörleri (64)

SP600125 (anthra[1,9]pyrazol-6(2H)-one); yapı taşı antrapirazolonun oluşturduğu ve sulu çözeltilerde zayıf çözünürlüğü olan, JNK ile katalitik aktivite gösteren bir maddedir (46,63). SP600125; JNK'nın ATP-kompetitif alanlarındaki rezidüleriyle spesifik etkileşime girer ve onlara yüksek afinite göstermektedir (63,64). SP600125'in; hem JNK hem de p38 yolağını inhibe ettiği düşünülmektedir. SP600125 yüzey moleküllerinin; JNK üzerindeki etkilerini, p38 MAPK üzerinden gösterdikleri düşünülmektedir (63). SP600125; hücrelerde c-Jun fosforilasyonunu inhibe ederken, aynı anda COX-2, TNF- α , IL-2, IL-10 ve matriks metalloproteinaz gen ekspersyonlarını da inhibe etmektedir (46, 63). p38 yolağının inhibisyonunu kısmen gerçekleştirdiği için ise IL-1 β ve IL-6 inhibisyonu üzerine etkisi daha azdır (46).

SP600125 veya diğerk JNK inhibitörleri; çeşitli doku ve hücrelerle yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. SP600125'in, dokularda iskemi-reperfüzyon veya diğerk sebeplerle ortaya çıkan hasarlarda koruyucu bir etkisi olduğu düşünölmektedir. SP600125'in ortaya çıkardığı etki, dokuyu hücre ölümünden korumaya yöneliktir. Deneysel olarak farklı ajanlarla akut hepatik hasar oluşturulan çalışmalarda, model oluşumundan önce ve sonra SP600125 uygulandığında, hepatik TNF üretiminde ve mortalitede önemli derecede azalmaların gözlemlendiğı bildirilmektedir. Yine karaciğerk yetmezlik modeli oluşturulmuş bir başka çalışmada ise; model oluşturulmadan 2 ve 6 saat önce ve sonrasında 2.saatte, subkutan olarak SP600125 verilmesi sonucunda, hepatosit apoptozisinde ve karaciğerk hasarını gösteren markır düzeylerinde azalma gözlemlendiğı tespit edilmiştir (63).

SP600125'in inhibitör etkisini; proapoptotik Bcl-2 aile üyelerini aktive ederek veya sitozolden mitokondriyal sitokrom c salınımını etkileyerek ya da prokaspazların salınımını inhibe ederek gösterdiği ileri sürölmektedir (63,65,66).

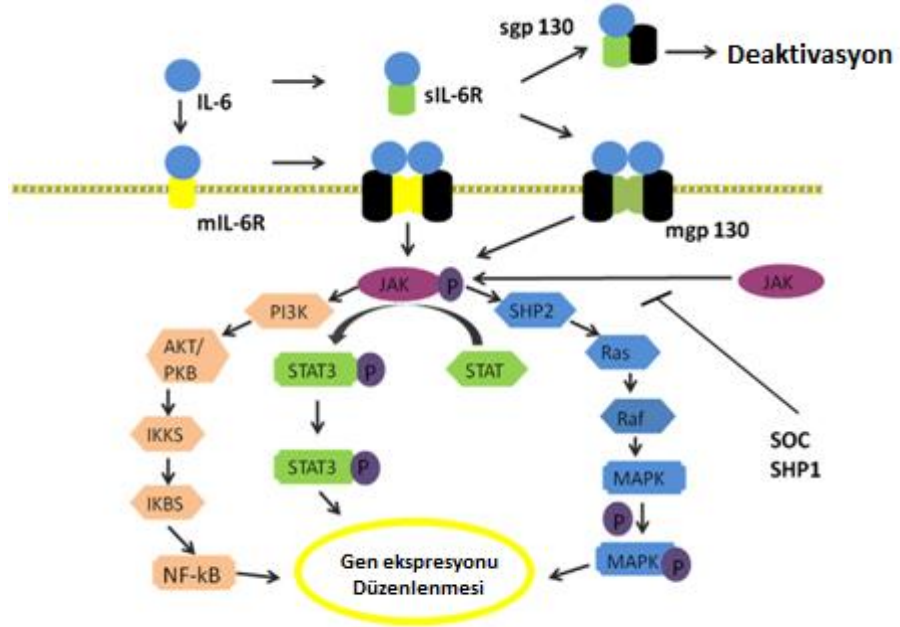
SİTOKİNLER

Sitokinler; hücreler arasında iletişimi sağlayan, immün sistemin düzenlenmesinde ve inflamatuvar yanıtta rolü olan proteinlerdir. İmmün sistem hücrelerinin birbirleriyle olan ilişkilerini düzenleyen, inflamasyon, hematopoezis, hücre büyümesi, hücre iyileşmesi gibi bağışıklık ve inflamatuvar olaylarda önemli görevler üstlenen molekülledir. Hücre zarında bulunan özğün reseptörleri aracılığıyla işlevlerini yerine getirmektedirler (67-70).

IL-1 β , IL-6 ve TNF α 'nın; öncül inflamatuvar sitokinler olduğu ve diyabetik hastalarda ekspresyonlarının, artan komplikasyonlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (71).

İnterlökin-6

B hücre stimulan faktörü ve B hücre farklılaştırıcı faktör olarak da isimlendirilen IL-6; yaklaşık 26 kD'luk multifonksiyonel, hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar bir sitokindir (27,72). IL-6; T hücreleri, B hücreleri, fibroblastlar, monositler, keratinositler, endotelial hücreler, mezengial hücreler, adipositler gibi birçok hücrede üretilmektedir (24,25,71). IL-6, ligand bağlayıcı IL-6 reseptörü (IL-6R) α zincirlerini içeren, IL-6R kompleksi aracılığıyla gen ekspresyonu üzerinde etkilidir. Bu kompleks, JAKs/STATs ve SHP-2/ERK-MAPKs aracılığıyla hücre içinde sinyal üretimini tetikleyerek ve gen ekspresyonu sonucunda transkripsiyon aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 4; 24,25,73).



Şekil 4. IL-6 sinyal yolağı (25)

İnterlökin-6; travma, yanık ve diğer sebeplerle doku hasarının söz konusu olduğu durumlarda salınır ve inflamasyona sebep olmaktadır (74). Anemi benzeri kronik hastalıklarda, anjiogenezde, akut faz yanıtında, kemik ve kıkırdak metabolizmalarında, nötrofil transfüzyonunda, immün yanıtta, lipid metabolizmasında, sistemik juvenil ve idiyomatik artritte önemli rol oynamaktadır

(24,25,72). IL-6 inhibisyonu, günümüzde bazı immun inflamatuvar hastalıklar için yeni bir tedavi protokolü olarak araştırmalarda yer tutmaktadır (72).

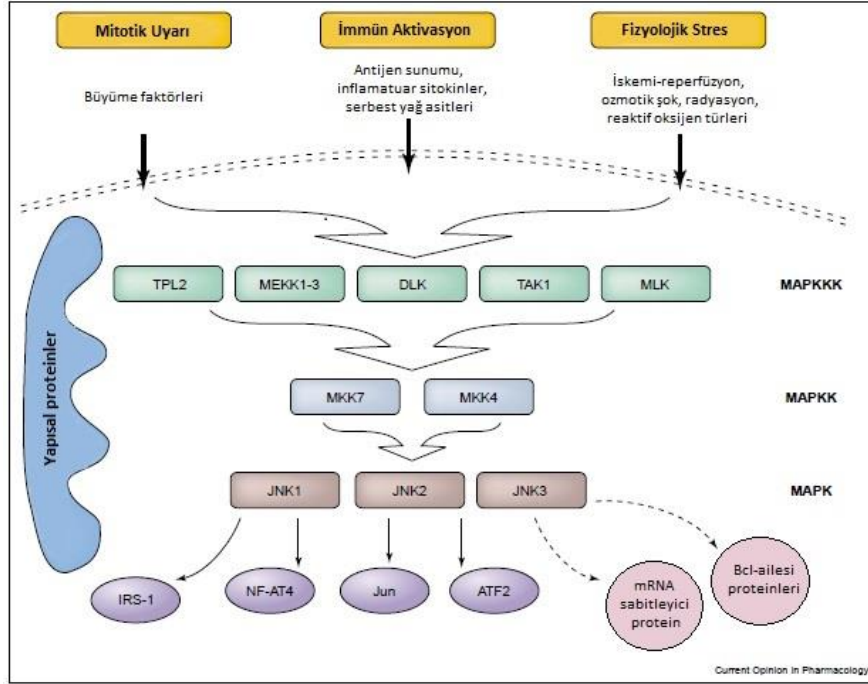
Kronik ve sistemik bir hastalık olan diyabetin komplikasyonlarında, IL-6'nın doku inflamasyonu ve yıkımı açısından düzenleyici etkisi olduğu bilinmektedir (24,25). IL-6 plazma konsantrasyonu, tip 2 diyabetli ve obez kişilerde yüksek olduğu için, önceleri yalnızca proinflamatuvar sitokin olarak kabul edilmiştir. Ancak daha sonraları antiinflamatuvar etkiye de sahip olduğu anlaşılmıştır (25).

İnterlökin-6; normal testis dokusunda interstisyel makrofajlar (75), Sertoli hücreleri (76), Leydig hücreleri (77) ve spermatogenik seri hücreleri (78) tarafından üretilmektedir (25,73). Sertoli hücrelerinin ve germ hücrelerinin fonksiyonlarını sürdürmesinde önemli rol oynamaktadır (73).

DİYABET, JNK VE IL-6 İLİŞKİSİ

Diyabetle beraber ortaya çıkan hiperglisemi; ROS artışı, oksidatif stresin meydana gelmesi ve tüm bunların sonucunda da çeşitli diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Hücre içerisinde biriken ROS, hücrede apoptozis mekanizmasını hızlandırdığı gibi, diyabetik erkeklerde sperm kalite ve fonksiyonunu da olumsuz yönde etkilemektedir.

Diyabetle beraber artan ROS düzeyi ve insülin direnci arasındaki mekanizma; öncelikli olarak MAPK yolağı olmak üzere, birkaç sinyal yolağı tarafından aktifleştirilmektedir (28,47). Yukarı akım yönlü (upstream) sinyaller, MKK4 ve MKK7 kinaz sinyallerinin indüklediği stres aracılığıyla, JNK aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 5;47,79).



Şekil 5. JNK'nin aktifleşme mekanizması (79)

Reaktif oksijen ürünlerinin, JNK'yu; apoptozisi baskılayan proteinler ailesinden Bcl-2 ve Bcl-XL'yi inhibe ederek direkt ya da Bad gibi proteinleri fosforile ederek indirekt aktifleştirdiğine inanılır. ROS artışı, mitokondri iç ve dış membranlarını bozar. Bu durum sonucunda, mitokondriyal membranda geçimsizliğe ve sitokrom c salınımına yol açarak ve Apaf 1, prokaspaz 9 ve efektör prokaspaz 3 kaskadını aktifleştirir ve apoptozise neden olur (79).

Tip 2 DM'de kronik inflamasyonun mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, IL-6'nın diyabetin fizyopatolojisinde ve komplikasyonların gelişiminde önemli bir sitokin olduğu düşünülmektedir (25). Bu sebeple günümüzde epidemiyolojik, genetik, insan ve kemirgenlerle yapılan *in vivo* ve *in vitro* birçok çalışmada IL-6'nın obezite, tip 1 ve tip 2 diyabetin patogeneizlerindeki rolü araştırılmaktadır (71).

Spranger ve ark. (80) tip 2 diyabetin gelişiminde sitokinlerin rolünü araştırdıkları yaklaşık 28.000 kişinin katıldığı prospektif çalışmalarında, dolaşımdaki inflamatuvar sitokinlerin tip 2 diyabetin patogeneizinde aktivite gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Hem IL-6 hem de IL-1 β 'nin birlikte yükselmesinin,

diğer faktörlerden bağımsız olarak tip 2 diyabet gelişim riskini arttırdığını ifade etmişlerdir. Bu bilgiler, tip 2 diyabet patogenezinde inflamatuvar reaksiyonun çok önemli olduğunu kuvvetli olarak desteklemektedir. Saha ve ark. (81) ise diyabetik sıçanlarda, oksidatif stresle beraber, IL-6'nın da doğru orantılı olarak arttığını ileri sürmektedirler.

c-Jun NH₂-terminal kinaze ve ERK'nın dahil olduğu MAPK yolaklarının etkinliği, IL-6'nın rol oynadığı gen ekspresyonuyla düzenlenmektedir. IL-6 ve yüksek kan glukozunun sergiledikleri karşılıklı sinerjik etkiye, JNK yolağının aracılık ettiği düşünülmektedir. JNK ve ERK yolakları, AP-1 aktivitesinin artmasına sebep olduğu için, tek başlarına zaten etkili olabilen IL-6 ve yüksek kan glukoz düzeylerinin etkisi daha da artmaktadır. Bu etkilerini de AP-1 alt üniteleri olan c-Jun ve c-Fos'un ekspresyonlarını 2-3 kat artırarak gerçekleştirmektedirler (24,25).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunulup, 2013/-01 no'lu karar ile onay alınmıştır (Ek 1). Bu onaydan sonra, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi destek için başvurulmuş ve 2013/25 no'lu proje olarak desteklenmesine karar verilmiştir.

DENEY HAYVANLARI

Bu çalışmada; Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilmiş, ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen, 3 aylık *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Denekler, deney süresince standart laboratuvar koşullarında (22 ± 1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulmuş, günlük içme suyu ile beraber %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina, Van, Türkiye) beslenmişlerdir.

DENEY PLANI

Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, genç erişkin 40 adet *Sprague-Dawley* erkek sıçandan, ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde;

1.Grup: Kontrol grubu; sadece pH'sı 4,2 olan 0,1M'lık sitrat tamponu intraperitoneal (i.p.) yolla verildikten sonra, yarısının 15. günde yarısının 30. günde sakrifiye edildiği grup (n=8),

2.Grup: Tek doz 60 mg/kg STZ (Sigma Aldrich, Canada, ABD) i.p. (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda çözülerek) verildikten sonra, 15.gün sakrifiye edilen grup (n=8),

3.Grup: Tek doz 60 mg/kg STZ i.p. (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda çözülerek) verildikten sonra, 30. gün sakrifiye edilen grup (n=8),

4.Grup: Tek doz 60 mg/kg STZ i.p. verilerek diyabet oluşturulup, STZ verilmesinden 48 saat sonra SP600125'in (JNK inhibitörü; Tocris bioscience, Philadelphia, ABD) zeytinyağında çözülerek, i.p. yolla 15mg/kg, 4 gün boyunca günde, 1 kez verildikten sonra, 15.gün sakrifiye edilen grup (n=8),

5.Grup: Tek doz 60 mg/kg STZ i.p. verilerek diyabet oluşturulup, STZ verilmesinden 48saat sonra SP600125'in i.p., 15 mg/kg, 4 gün boyunca, günde 1 kez verildikten sonra, 30. gün sakrifiye edilen grup (n=8) olmak üzere beş farklı grup oluşturulmuştur.

Deneklerin kan-glukoz düzeylerine; deneye başlamadan önce, STZ uygulamasının ardından deney sonuna kadar, 15 günde bir kuyruk veninden alınan kan örneklerinde, glukometre (IME-DC, Hof, Almanya) ile bakılmıştır. Aynı zamanda deney başlangıcı ve sonunda tüm deneklerimizin vücut ağırlıkları ölçülmüştür.

Planlanan deney süresini tamamlayan deneklerden, ketasol (Ricterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, testis doku örnekleri alınıp, ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal gözlemler için işlemlendirilmiştir.

Elde edilen ağırlık verileri ile her bir denek için;

“TA / VA = Toplam testis ağırlığı (TA)/ Vücut ağırlığı (VA)x 100” formülü kullanılarak testis ağırlıklarının ve vücut ağırlıklarına oranları hesaplanmıştır.

IŞIK MİKROSKOBİKVE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA VE DEĞERLENDİRME

Testis doku örnekleri, %10'luk formaldehitte (Sigma-Aldrich) fikse edildikten sonra dokular yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçilmiştir. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile muamele edilmiş, önce yumuşak parafin (Merck Millipore), sonrasında sert parafine (Merck Millipore) alınarak, parafin bloklar elde edilmiştir. Dokulardan alınan 5 mikrometre (µm) kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak Hematoksilen+Eozin (H+E) ve Periodik Asit Schiff (PAS) boyaları uygulanmıştır.

Seminifer tübül çapları; tüm deneklerin H+E boyanmış preparatlarının kullanımıyla, her hayvandan alınan testis kesitlerinde her preparatta, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş 10 tübülün enine kesiti alınarak x200'lük büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir (22).

Johnsen Skoruması

Johnsen skoruması; H+E boyaması uygulanan preparatların her birinde, 10 farklı sahada yeralan, rastgele seçilmiş 10 farklı seminifer tübülde, Tablo 1'de belirtilen kriterlere göre gerçekleştirilmiştir (82,83). Bu inceleme için; Olympus BX51 marka mikroskopun, x400'lük büyütmesi kullanılmıştır.

Tablo 1. Johnsen Skorlaması

Skor 1	Seminifer túbüllerde 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 túbüller var.

TUNEL Prosedürü

Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanılmıştır. Poli-L-lysin kaplı lama alınan kesitler, gece boyu (12 saat) 37°C'lik etüvde bekletilmiş, ardından kesitler 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Deparafinizasyon işlemi için toluol, rehidrasyon işlemi için alkol serilerinden geçirilen kesitler, daha sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH 7.4; İnvitrogen, Kaliforniya, ABD) ile yıkanmıştır. Proteinlerin sindirilmesi için, proteinaz K solüsyonu (Merck Millipore) ile muamele edilen kesitler, sonra distile sudan geçirilmiştir. Bundan sonraki aşamalar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon SA. Merck Millipore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Endojen peroksidazın bloke edilmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksit alınmış ve daha sonra kesitler dengeleme tamponu ile oda ısısında 30 dk bekletilmiş ve ardından sırasıyla tdt enzimi, durdurma/yıkama tamponu ve anti-digoksinin peroksidaz ile muamele edildikten sonra,3,3-dia-

minobenzidine tetrahydrochloride dihydrate (DAB) kullanılarak kromojenize edilmiş ve kesitlere hematoksilin zıt boyaması yapılmıştır. Son olarak kesitler, alkol ve toluol serilerinden geçirilerek kapatılmıştır.

Apoptotik Hücre ve Tübül İndeksi

Diyabetik testis dokularındaki apoptoz, “apoptotik hücre indeksi” ve “apoptotik tübül indeksi” olmak üzere, preparatların hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer değerlendirici tarafından, iki farklı yöntem ile değerlendirilmiştir.

Apoptotik hücre sayılarını değerlendirmek için; x20'lik objektif kullanılarak, toplam 1000 hücredeki apoptotik hücreler sayılarak, “apoptotik hücre indeksi” hesaplanmıştır (84).

Apoptotik tübül sayısını değerlendirmek için ise x20'lik objektif kullanılarak, ortalama 100 tübülde, en az 3 ve daha fazla apoptotik hücre içeren seminifer tübüller sayılarak, “apoptotik tübül indeksi” oluşturulmuştur (85).

f-JNK ve IL-6 İmmunohistokimya Prosedürü

f-JNK ve IL-6 immünreaktiviteilerinin değerlendirilebilmeleri için poly-L-lisin kaplı lamlara alınan 5µm'lik kesitlere, deparafinizasyon uygulanmış ve antijen geri kazanımı için lamlar 10 mM sitrat tamponunda (pH=6) kaynatılmıştır. Sonrasında kesitler endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için, 5dk. süreyle %3'lük hidrojen peroksitle muamele edilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, normal keçi serumunda (Vector Laboratories, Burlingame, CA, ABD) 30 dk. inkübe edildikten sonra, serum fazlası alınan kesitler, tavşan poliklonal fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antikoru (1:50 dilüsyonda Tris tampon solüsyon (TBS) içinde; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, ABD) ve tavşan poliklonal IL-6 antikoru (1:400 dilüsyonda TBS içinde; Abcam, Cambridge, MA, ABD) +4°C'de, gece boyunca maruz bırakılmıştır. Bunu takiben

TBS ile yıkanan kesitlere, biyotinlenmiş anti-tavşan antikoru (Vector Laboratories) 1:400 dilüsyonunda uygulanarak, 30 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir. Ardından kesitler streptavidin-biyotin-peroksidaz kit (Vector Laboratories) ile 10 dk muamele edilmiştir. DAB (Vector Laboratories) kullanılarak kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin zıt boyaması yapılmış ve rutin histolojik işlemlerden geçirilip, entellan ile kapatılarak, daimi preparat haline getirilmişlerdir. Elde edilen preparatlar Olympus BX51 mikroskobunda incelenerek, değişik büyütmelemlerde fotoğrafları çekilmiştir.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Yapılan tüm immünohistokimyasal işlemlerin sonuçları; histolojik skorlama (HSCORE) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler; preparatların hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer değerlendirici tarafından, her preparatta rastgele seçilen beş alanda, x20 objektif kullanılarak yapılmıştır. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirilmiştir. Skorlama, kesitlerde immünreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin ($i \times P$; i : boyanma derecesi, P : her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) ölçüt olarak alındığı, semikantitatif bir yöntemle gerçekleştirilmiştir ve formül kısaca $HSCORE = \sum Pi (i +1)$ şeklinde ifade edilebilmektedir (86).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Yapılan tüm immünohistokimyasal işlemlerin değerlendirmeleri, preparatların hangi grup hastaya ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer değerlendirici tarafından, her preparatta rastgele seçilen beş alanda, x20 objektif kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim dalında SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanılmış, değerler ortalama \pm standart sapma (SD) ve minimum-maksimum olarak alınmıştır. Herbir gruptaki değişim düzeyi hesaplanıp, gruplar arasındaki bu farklılık düzeyi için $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki tüm

parametreler arasında farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile araştırılmıştır. Farklılık saptanan sonuçların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için de; Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ VE AĞIRLIK BULGULARI

Çalışmanın başında tüm deneklerin 1. gündeki kan-glukoz düzeyleri ve vücut ağırlıkları kayıt edilmiştir.

Tüm grupların kan-glukoz düzeyleri; başlangıçta ve diyabet oluşturulduktan sonra her 15 günde bir ölçülmüş ve tüm değerler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Kan glukoz düzeyleri (mg/dl)

	Kontrol Grubu (n=8)	2. Grup (n=8)		3. Grup (n=8)		4. Grup (n=8)		5. Grup (n=8)	
			P		P		P		P
1.gün	91±11 (71-105)	99±11 (79-119)		93±10 (75-102)		94±9 (78-105)		92±14 (63-105)	
15.gün	105±9 (90-120)	487±109 (299-600)	0.001*	454±107 (79-119)	0.001*	569±50 (467-600)	0.001* 0.031†	520±97 (355-600)	0.001* 0.207
30.gün	99±7 (89-109)			496±148 (277-600)	0.003*			556±73 (400-600)	0.003* 0.495

*:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †:2.grup ile karşılaştırıldığında, p<0,05 anlamlı kabul edildiğinde

Tüm gruptaki deneklerin başlangıçta ölçülen kan glukoz düzeyi değerleri 63-119 mg/dl arasında değişmektedir. Kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olan denekler diyabetik kabul edilmiştir. Deney gruplarına STZ uygulandıktan sonraki 15. günde ölçülen kan glukoz değerleri ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (P=0.001). İkinci, 3., 4. ve 5. grupta ölçülen tüm değerler, diyabet oluşumunu doğrulayacak şekilde >250 mg/dl'nin üzerindedir.

Otuzuncu günde 3. ve 5. grupların kan glukoz değerleri ile , kontrol grubu değerlerini kıyasladığımızda ise aralarındaki anlamlı farkın devam ettiği (her ikisi için; P=0.003), ancak 3. ve 5. grup değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı (P=0.495) tespit edilmiştir.

Tablo 3. Ağırlık tablosu

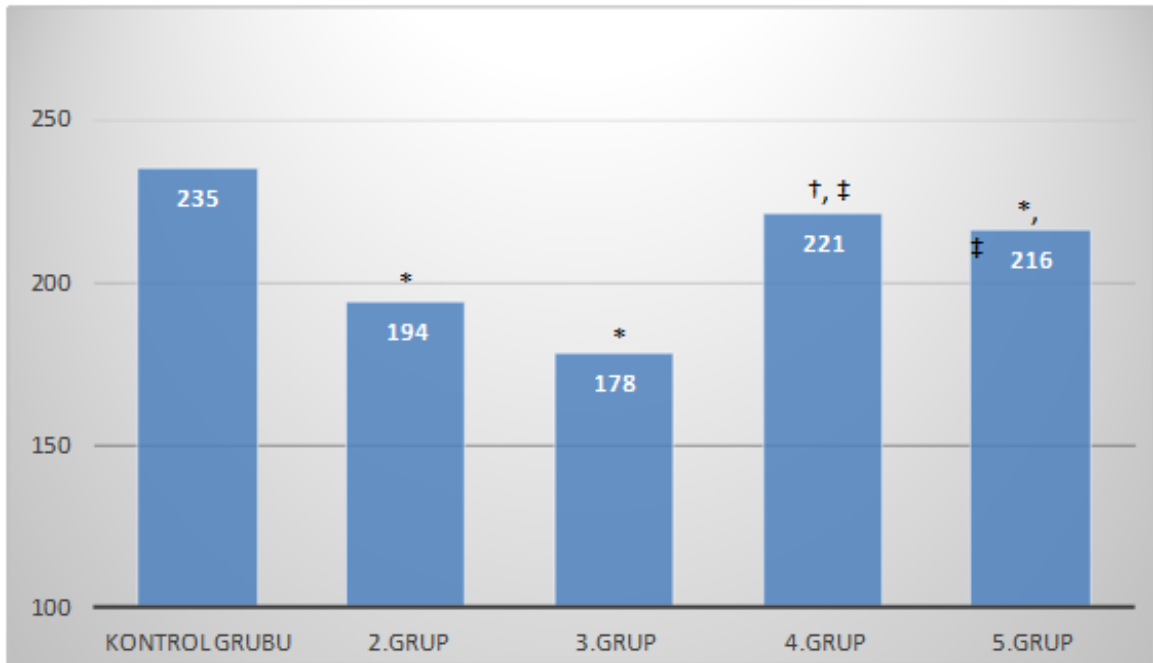
	Kontrol Grubu (n=8)	2. Grup (n=8)	3. Grup (n=8)	4. Grup (n=8)	5. Grup (n=8)
Kilo farkı (g)	12±17 (-30-20)	-11±30 (-30-50)	-69±41 (10-130)	-64±33 (20-110)	-36±34 (-10-105)
P		0,113*	0.002*	0.001* 0.007†	0.004* 0.126
TA (g)/VA(g)	1,34±0,18 (1,20-1,70)	0,87±0,11 (0,70-1,10)	1,08±0,99 (0,90-1,20)	1,01±0,22 (0,60-1,30)	1,10±0,21 (0,90-1,30)
P		0,001*	0,002*	0,006* 0,110	0,011* 0,164

*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: 2.grup ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir

Tüm gruptaki deneklerin ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark belirlenip, bu farkın gruplar arasındaki değişiminin anlamlılık düzeyine bakıldığında; kontrol grubu ile 2. grup arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (P=0.113; Tablo 3) Ancak 3., 4. ve 5. grupta yeralan tüm deneklerde, kontrol grubuna göre

anlamli olan ağırlık kaybı yaşandığı tespit edilmiştir (sirasıyla $P=0.002$, $P=0.001$ ve $P=0.004$). İkinici ve 4. grup deneklerin ağırlık farkları kıyaslandığında; 4.grupta anlamli bir azalma ($P=0.007$; Tablo 3) tespit edilmiştir. Üçüncü grup ile 5. grup karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunmamıştır ($P=0.126$; Tablo 3).

İkinici, 3.,4. ve 5. grup testis ve vücut ağırlık oranları ile kontrol grubu testis ve vücut ağırlık oranı kıyaslandığında, anlamli bir azalma tespit edilmiştir ($P=0.001$; $P=0.002$; $P=0.006$; $P=0.011$; Tablo 3). İkinici grup ve 4. grup testis ve vücut ağırlık oranlarını karşılaştırdığımızda ise anlamli bir farklılık izlenememiştir ($P=0.110$; Tablo 3). Her ne kadar inhibisyon uygulanan 5. grupta bu oran daha yüksek bulunsa da, 3. grup değerlerini, 5. grup ile kıyasladığımızda; bu gruplar arasında da istatistiksel olarak herhangi bir anlamlilik bulunamamıştır ($P=0.164$; Tablo 3).



Şekil 6. Seminifer tübül çapı değerleri (µm)

*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P<0,001$;†: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P=0.012$; ‡: 2.gruba göre ve 3.grup ile karşılaştırıldığında $P<0,001$.

Tüm deney gruplarının seminifer tübül çap değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 2., 3., 4. ve 5. grup deneklerimizin seminifer tübül çap değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (sırasıyla $P<0.001$, $P<0.001$, $P=0.012$, $P<0.001$; Şekil 6). İkinci grup ile 4. grup karşılaştırıldığında ise 4. gruptaki seminifer tübül çapı değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ($P<0.001$; Şekil 6) ve yine 3. grup ile 5. grup değerleri birbiriyle kıyaslandığında; 5. grubun seminifer tübül çaplarındaki artışın anlamlılığı ortaya çıkmıştır ($P<0.001$; Şekil 6).

Tablo 4. Johnsen skorlaması değerleri

Johnsen Skorlaması Değerleri Ort±Sd (Min-Max)	Kontrol Grubu (n=8)	2. Grup (n=8)	3. Grup (n=8)	4. Grup (n=8)	5. Grup (n=8)
	8.8±0.16 (8.7-9.2)	7,7±0,32 (7.3-8.1)	6,5±1 (5.5-7.8)	8,1±0,49 (7.1-8.6)	7,74±0,18 (7.3-7.9)
P		0.001*	0.001*	0.001* 0.057	0.001* 0.01†

*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: 3.grup ile karşılaştırıldığında, $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Johnsen skorlaması 1970 yılında ileri sürülen, testis doku örneklerinde kullanılan ve günümüzde geçerliliğini hala koruyan bir skorlama yöntemidir. Bu skorlama yapılırken; tüm grupların H+E boyanmış preparatları kullanılarak, her kesitte rastgele seçilmiş 10 farklı sahada, 10'ar adet seminifer tübül içerisindeki spermatogenik seri hücrelerinin hangi aşamada olduğu değerlendirilmiştir.

Tüm deney gruplarında elde edilen ortalama Johnsen skor değerlerinin, kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (tüm gruplar için $P<0.001$; Tablo 4). İkinci grup ile 4. grup karşılaştırıldığında ise 4.gruptaki deneklerimizin Johnsen skor değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değilken ($P=0.057$; Tablo 4), 5. grup Johnsen skor değerlerinin ise 3. gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($P=0.01$; Tablo 4) tespit edilmiştir.

MORFOLOJİK BULGULAR

Kontrol Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait deneklerden alınan 5µm'lik testis doku kesitleri rutin H+E ve PAS boyaları uygulandıktan sonra incelendiğinde; tunika albugineanın düzenli bir biçimde seminifer tübülleri sardığı izlenmektedir (Şekil 7).

Bazal membran üzerine yerleşmiş olan prizmatik şekilli Sertoli hücreleri ve bu hücrelerin uzantıları arasında yerleşmiş olan spermatogenik seri hücreleri, normal organizasyonlarını sergilemektedir (Şekil 8,9). Spermatogenik seri hücreleri, bazalden lümene doğru spermatogonyumlar, hemen üstlerinde spermatosit I ve spermatosit II'ler ile lümene en yakın kısımda da olgunlaşmakta olan spermatidler olarak dizilmişlerdir (Şekil 8). Herbir seminifer tübül, bir kısmı kuyrukları lümene gelecek şekilde yerleşmiş olan veya tamamen lümende bulunan çok sayıda sperm içermektedir. Spermatogonyumlar, bazal membranın hemen üzerinde ve Sertoli hücreleriyle aynı hizada yerleşmişlerdir. Spermatosit I'ler ise belirgin nükleuslu ve geniş sitoplazmalı olup, en büyük çapa sahip spermatogenik seri hücreleri olarak tübül duvarında kolayca ayırt edilebilmektedir. Spermatosit I'ler, spermatogonyumların hemen üzerinde ve seminifer tübül epitelinin ortalarında birkaç sıra halinde dizilmiş olarak izlenmektedir. Spermatosit II'lere ise genelde rastlanmazken, spermatosit I'lerin hemen üzerinde nadir olarak bazı tübüllerde görünmektedirler (Şekil 9). Spermatidler lümene yakın olarak yerleşirken; koyu boyanan küçük nükleusları ve nükleusun tamamen üzerinde bulunan kep şeklindeki PAS (+) akrozom yapısıyla tanınmaktadırlar. Geç spermatidler ise, lümende görülen kuyrukları ve koyu uzun boyanan başlarıyla ayırt edilebilmektedirler. Bunun yanısıra spermelerde lümende izlenmektedirler (Şekil 10).

Seminifer tübül epitel hücreleri, PAS (+) boyanan bazal lamina üzerine yerleşmektedirler (Şekil 10). Tübüller arasında bulunan interstisyel alanda çeşitli bağ dokusu hücrelerinin yanısıra, Leydig hücreleri ve kapillerlerde bulunmaktadır (Şekil 9,10). Leydig hücreleri, kan damarları etrafında yerleşmiş ve genellikle poligonal şekilli, eozinofilik sitoplazmaları ile normal histolojik yapıda izlenmektedir (Şekil 9,10).

Kontrol grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik bulguları normal bir testis doku organizasyonu sergilemektedir (Şekil 7-10).

İkinci Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

Bu gruba ait testis doku kesitlerinde; düzensiz sınırlı seminifer tübüller ve interstisyel bağ dokuda artış dikkati çekmektedir (Şekil 11, 12).

Diyabet oluşturulup 15 gün sonra sakrifiye edilen bu grubun testis kesitlerinde; normale yakın bir görünüm sergileyen seminifer tübüller yanında; diyabetin etkisiyle, bazal membranda içe katlanmalar (ondülasyonlar), tübül duvarında sıkça vakuolizasyonlar ve hücresel yapıda bozulmalar gözlenmektedir (Şekil 11,12). Tübüllerde şekilsel ve ayrıca morfometrik analiz ile de belirlediğimiz boyut farklılıkları en dikkat çekici özelliklerdir. Bazı tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinde vakuolizasyonlar ve yer yer organizasyon bozukluğu gözlenmektedir. Bu tübüllerde spermatosit I'lerden sonraki seri hücrelerinin kaybı dikkati çekmektedir (Şekil 11, 12). Seminifer tübül bazal membranları ile germinal epitel arasında, kontrol grubunda gözlenmeyen ayrışmalar bulunmaktadır. Diğer bazı tübüllerde ise boyutlarının normale yakın olduğu, bunların tüm seri hücrelerinin yani spermatogonyum, spermatosit I, spermatid ile spermleri bulunduran normal bir histolojik görünüm sergiledikleri belirlenmiştir (Şekil 12,13).

İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde, bu büyütmelemlerle herhangi bir değişim izlenmemektedir. Tübül çaplarının küçülmesine bağlı olarak yer yer tübüllerin birbirinden ayrıldığı, ancak bu mesafelerin bağ doku tarafından doldurulduğu dikkati çekmektedir. Kontrol grubuna göre, bu grupta interstisyel alanda konjesyonun daha da arttığı gözlenmektedir (Şekil 12,13).

Üçüncü Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

Tübül çaplarındaki azalmanın çok belirgin olduğu bu gruba ait kesitlerde; epitel kalınlığının oldukça azaldığı, spermatogenik seri hücre diziliminde organizasyon bozukluğu, germ hücre kayıpları ve hatta sadece

spermatogonyumların ve apoptotik görünüm sergileyen spermatozoidlerin bulunduğu tübüller gözlenmektedir (Şekil 14-16). Tübüllerdeki spermatogonik hücre serilerinin bir kısmının kaybolması ve spermatogenezin bozulması; ayrıca tübüllerin bazal kısmına yakın olarak yerleşmiş bulunan Sertoli hücrelerinin dejenerasyonu sebebiyle, germinal epitelin bazı bölgelerinde geniş vakuollerin ortaya çıktığı belirlenmiştir. Tübüllerin bir kısmı Sertoli hücreleri dışında spermatogonik seri hücrelerinin tümünü içerirken (Şekil 15, 16), bir kısmında ise sadece Sertoli hücreleri ile birlikte spermatogonyumlar ve çok az sayıda spermatozoidlerin bulunduğu izlenmektedir. Ancak kontrol grubundan ve 2. gruptan farklı olarak yer yer dev hücre gelişiminde olan germ hücreleri farkedilmektedir (Şekil 15, 16).

İnterstisyel alanda ise, ekstrasellüler matrikste ve konjesyonda artış dikkat çekmektedir (Şekil 15, 16).

Dördüncü Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

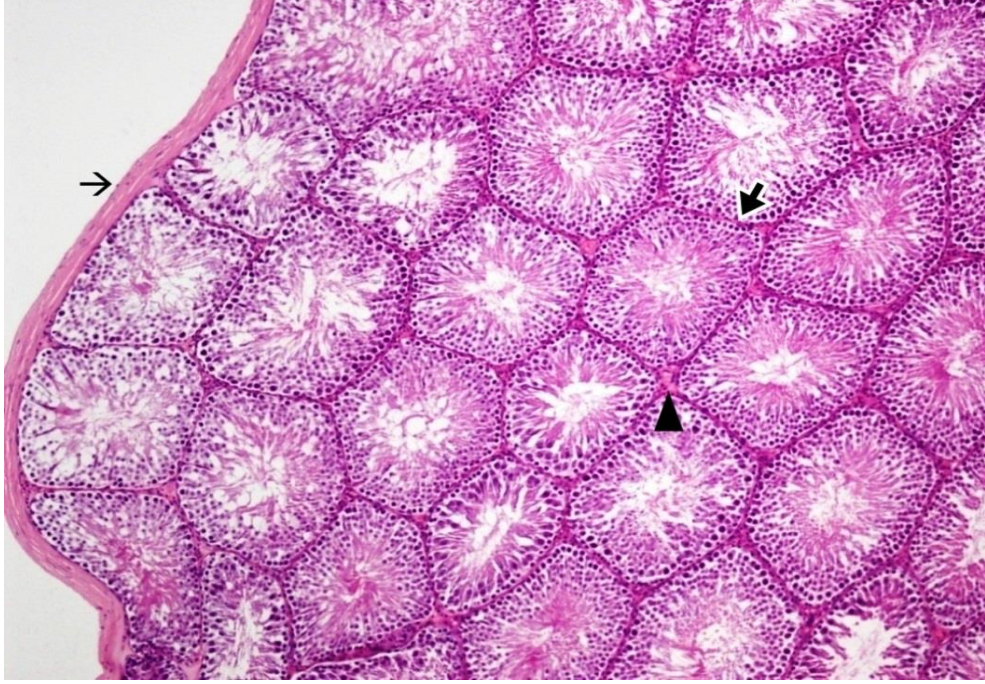
Bu gruptaki testis dokusu kesitlerinde, seminifer tübüllerin çoğu normal yapılarını korumuş olmakla beraber; bazı tübüllerde germinal epitel hücreleri ile bazal membranları arasında ayrılmalar gözlenmektedir. Tübüllerin büyük bir kısmında Sertoli hücreleri ve spermatozoidleri içeren tüm spermatogonik seri hücrelerinin mevcut olması ve bütünlüklerini koruması dikkat çekmektedir (Şekil 17). 2. gruba kıyasla bu grupta, seminifer tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyonlar ve bazal membrandan ayrılmaların daha az olduğu görülmektedir. Kontrol grubu testis doku kesitlerindeki görünüme yakın bir histolojik organizasyona sahip bir görünüm sergilemektedirler (Şekil 17-19).

İnterstisyel alanda konjesyonun 2. gruba kıyasla göreceli olarak azaldığı, ancak tübül çapları daha fazla olduğu için, neredeyse normale yakın bir görünüm sergiledikleri belirlenmiştir (Şekil 18,19).

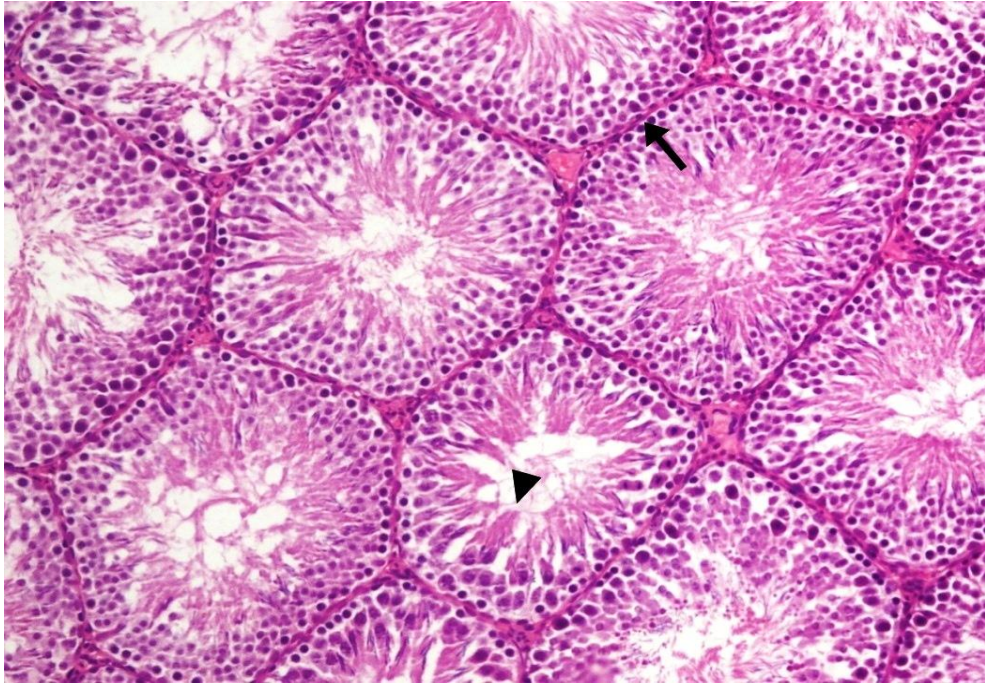
Beşinci Gruba Ait Işık Mikroskopik Bulgular

Bu gruptaki seminifer tübüllerin çoğunda spermleri de içeren tüm spermatogenik seri hücrelerinin var olduğu izlenmektedir. JNK inhibisyonu etkisiyle gözlenen hücresel organizasyondaki histolojik görünümün, 3. gruba göre oldukça normale yakın olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 20, 21, 22). Bununla birlikte, tübüllerde spermatogenik seri hücrelerindeki vakuolizasyonlar ve Sertoli hücre bağlantılardaki zayıflamalar, inhibisyona rağmen 30. günde gözlenen dejeneratif bulgulardır (Şekil 21, 22). Ancak bu grupta 3. gruba göre interstisyel sahada konjesyon daha azalmış olarak gözlenmektedir (Şekil 20).

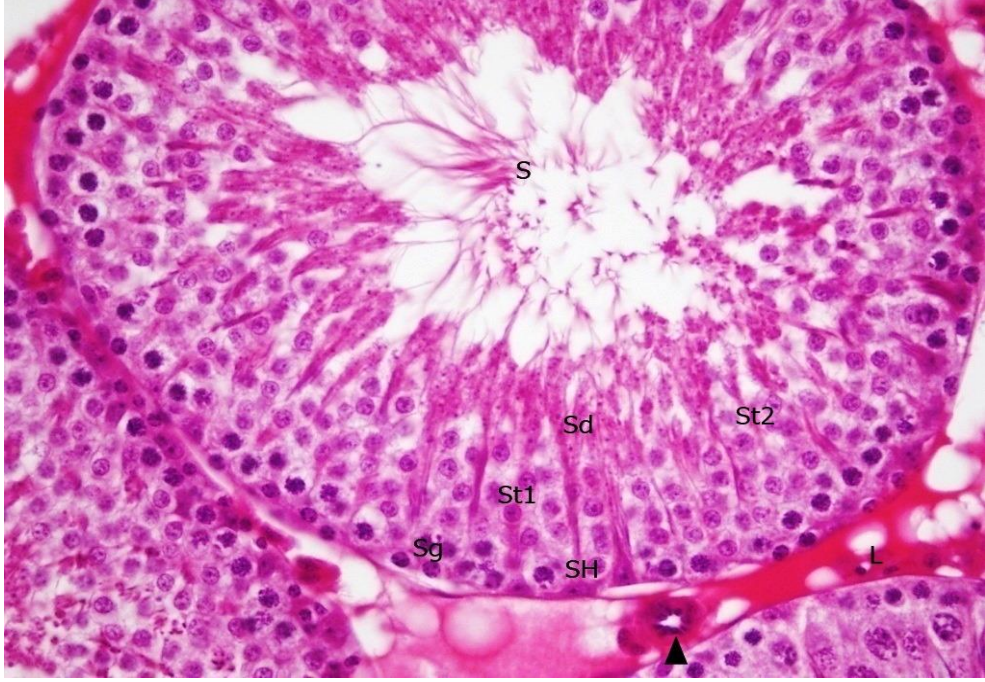
Işık Mikroskopik İncelemelere Ait Şekiller



Şekil 7. Kontrol grubuna ait olan testis kesitinde; tunica albuginea (→), seminifer tübüller (➡) ve aralarındaki interstisyel bağ doku (▲) gözlenmektedir. H+E, X100.



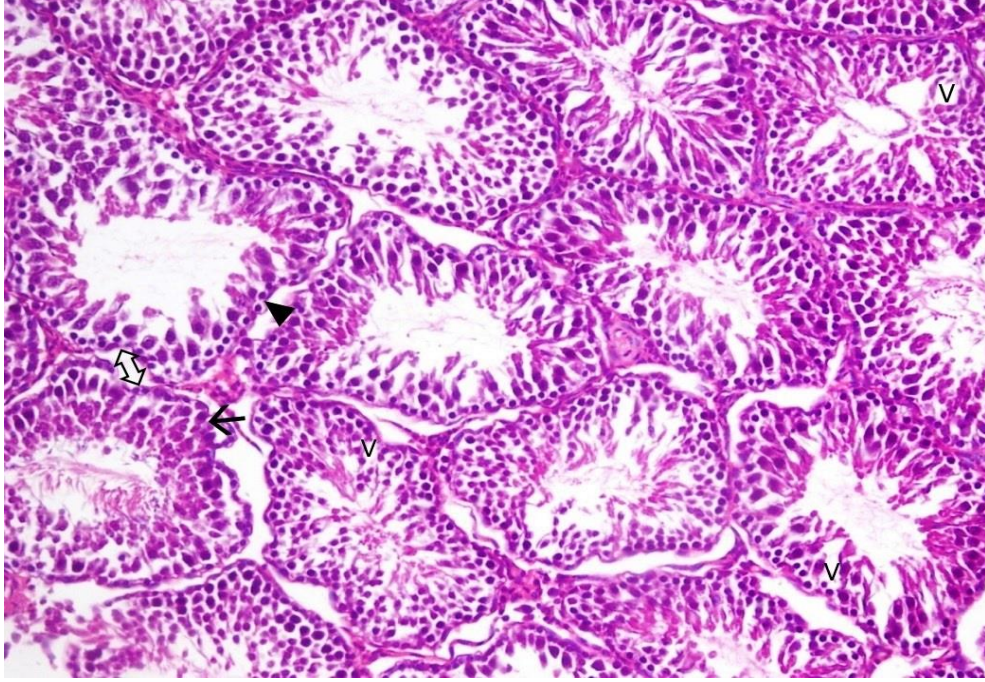
Şekil 8. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerde, düzgünbazal membran yapısı (→), spermatogenik seri hücrelerive lümende sperm kuyrukları görülmektedir (▶). H+E, X200.



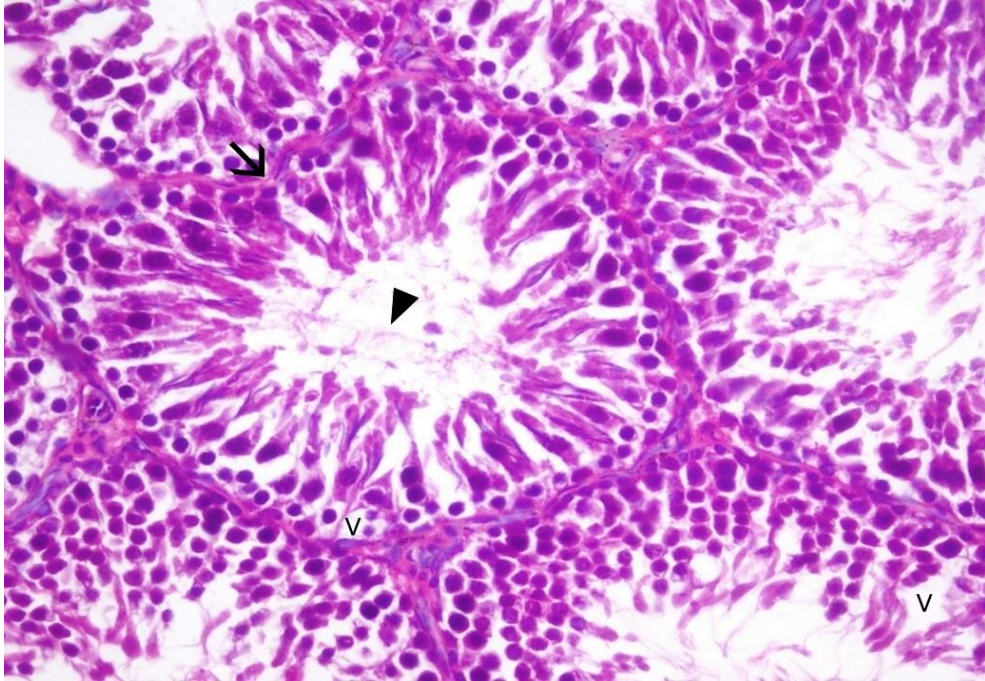
Şekil 9. Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerde, germ hücreleri bazaldan lümene doğru; spermatogonyum'lar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatosit-II'ler (St2), spermatidler (Sd) ve sperm (S) şeklinde düzenli dizilim göstermektedir. Sertoli hücreleri (SH) ise tübüllerin bazal laminası üzerinde yerleşmektedir. İnterstisyel bölgede de, Leydig hücrelerinin (L), kan damarları (▶) etrafında yerleşmiş olduğu izlenmektedir. H+E, X400.



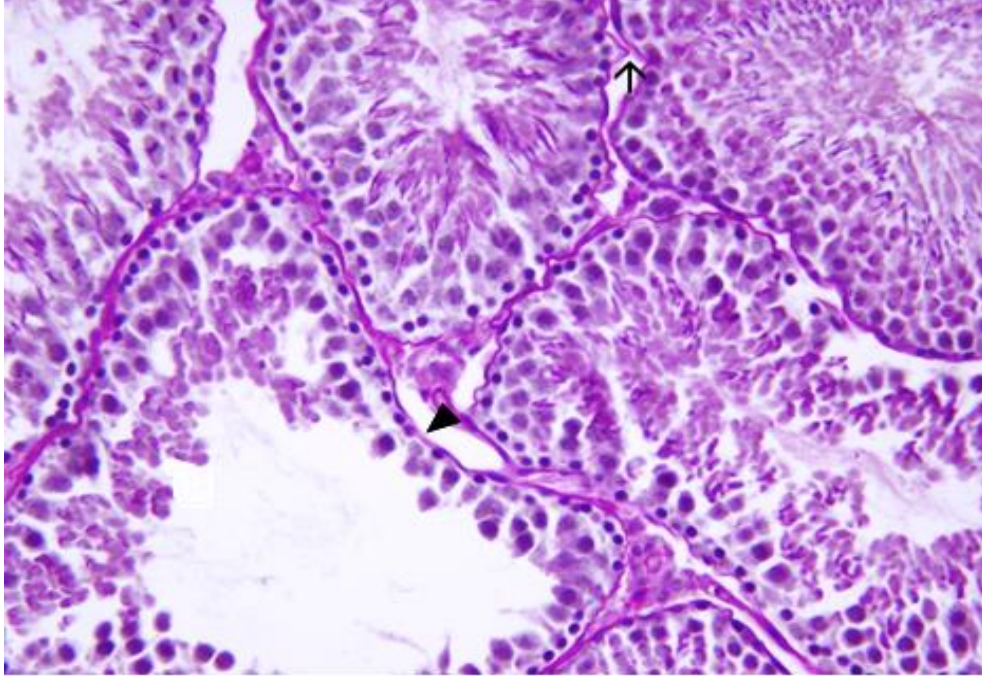
Şekil 10. Düzenli yerleşim gösteren ve spermatogenik seri hücreleri içerisindeki erken (Sd) ve geç spermatidler (Sz) nükleus üzerine oturmuş kep şeklindeki PAS (+) akrozom (→) yapıları ile dikkati çekmektedir. PAS+HL, X400.



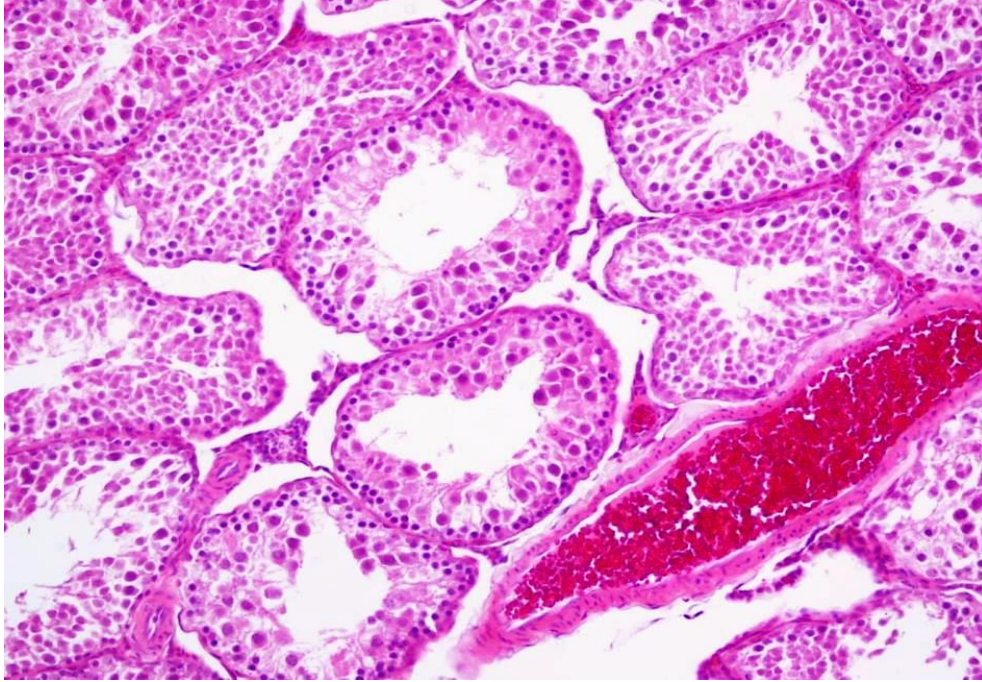
Şekil 11. İkinci gruba ait mikrografta, bazı tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinin tümünün devamlılığını sürdürdüğü (→), ancak bazılarında tüm seri hücrelerinin gözlenemediği (▶) dikkat çekmektedir. V: Vakuolizasyon, ↔: Bazal membran ondülasyonları. H+E, X200.



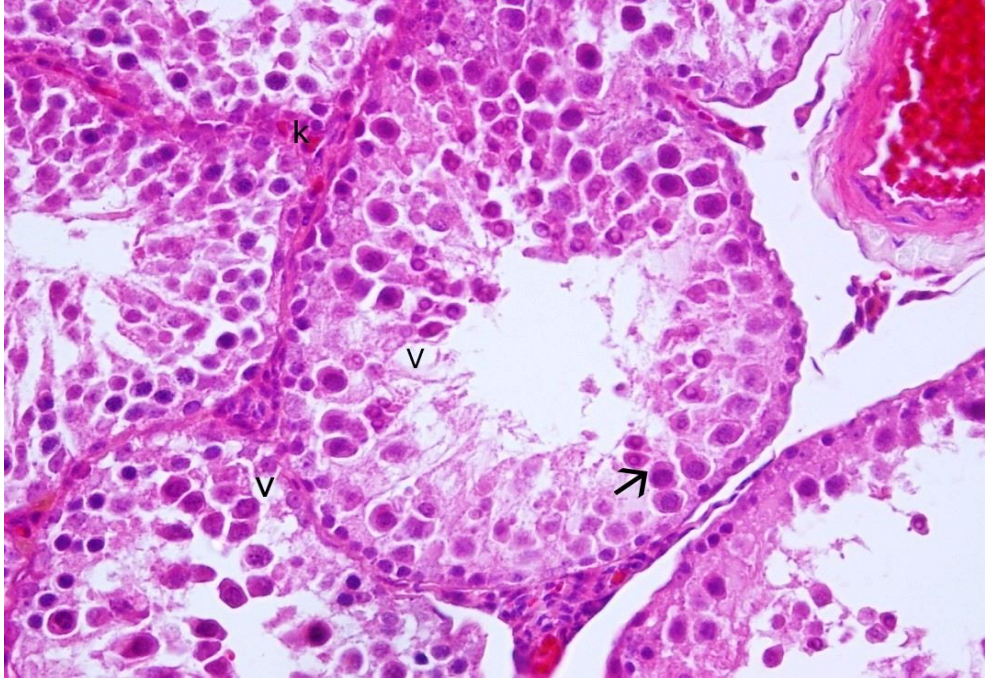
Şekil 12. STZ uygulandıktan sonra 15.gün sakrifiye edilen gruba ait olan testis kesitinde, tübül duvarında invaginasyon (→) ve lümeninde sperm yoğunluğunda azalma (▶), spermatogenik seri hücrelerinin devamlılığını sürdürmekle beraber, hücrelerde sitoplazmik kayıpların, vakuolizasyonların (V) ortaya çıktığı gözlenmektedir. H+E, X400.



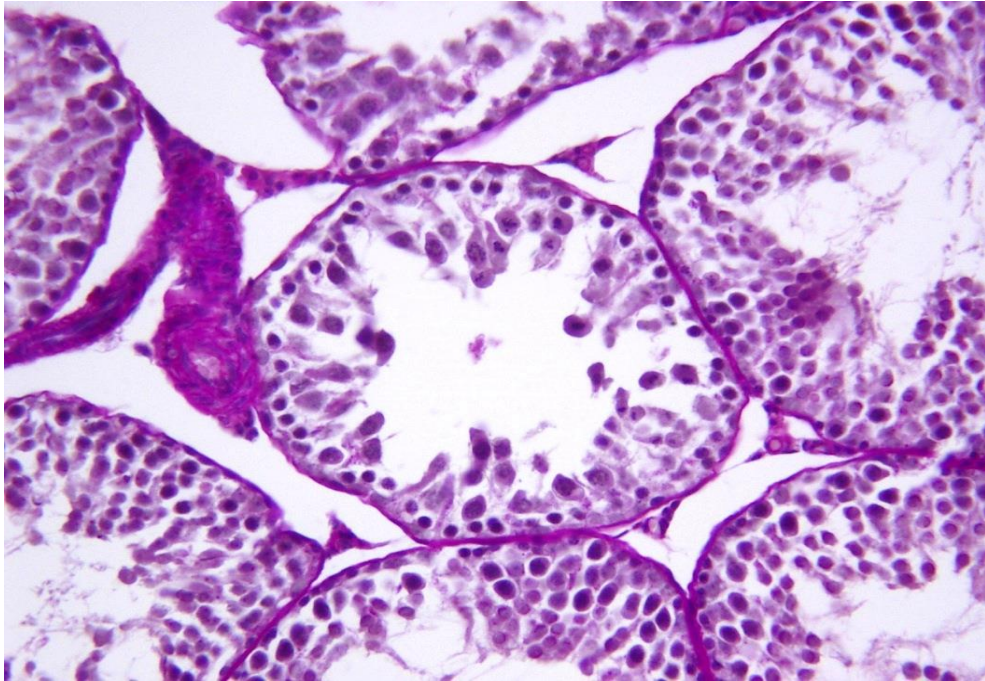
Şekil 13. Üçüncü gruba ait mikrografta, spermatogenezin tam olarak izlenemediği bir tübül (►) ve bazal membrandan ayrılmalar (↑) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X400.



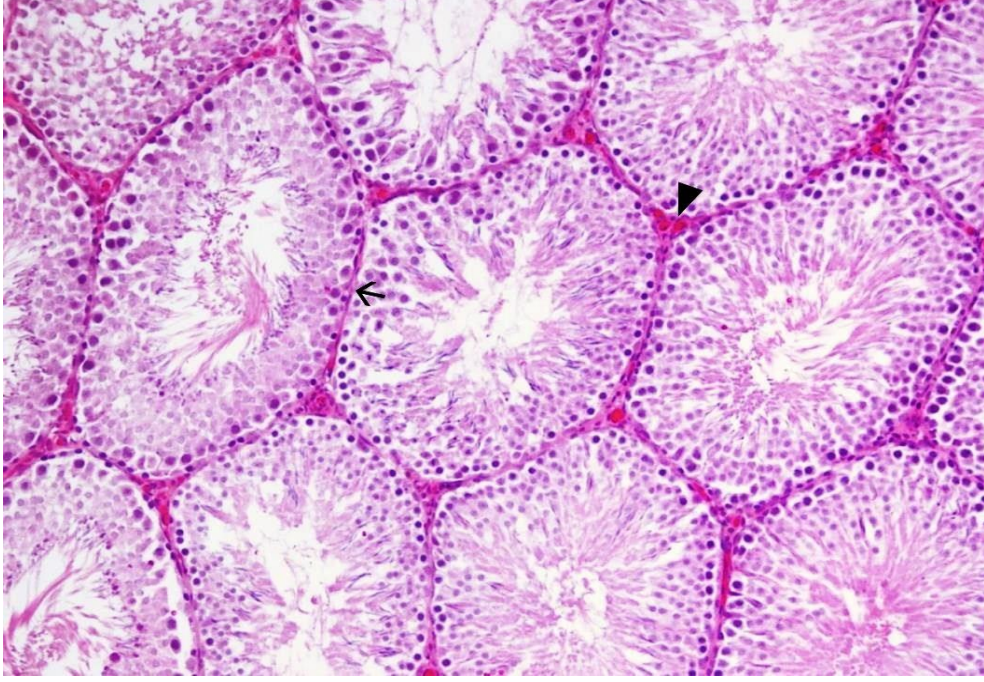
Şekil 14. Üçüncü gruba ait sıçan testis dokusundan alınan bir görüntüde, diyabetin testis dokusunda oluşturduğu etkiler gözlenmektedir. H+E, X200.



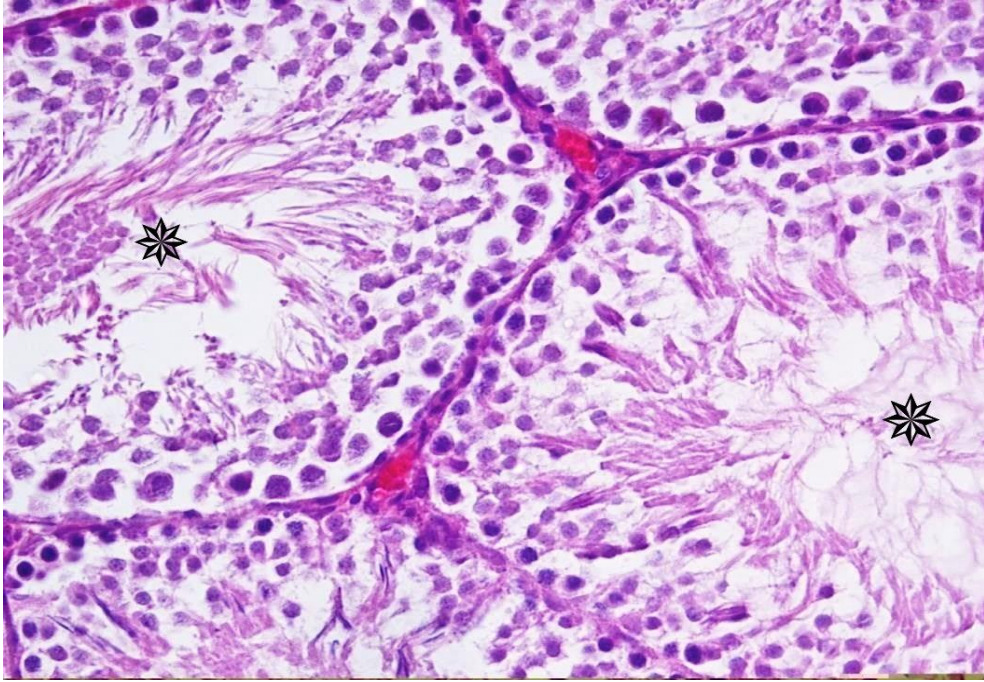
Şekil 15. Üçüncü grup seminifer tübüllerinde germ hücre kayıpları ve disorganizasyon (→), yanısıra vakuolizasyonlar (V), bazı tübüllerde dev hücre gelişimi dikkati çekmektedir. Ayrıca interstisyel alanda konjesyon artışı (k) gözlenmektedir. H+E, X400.



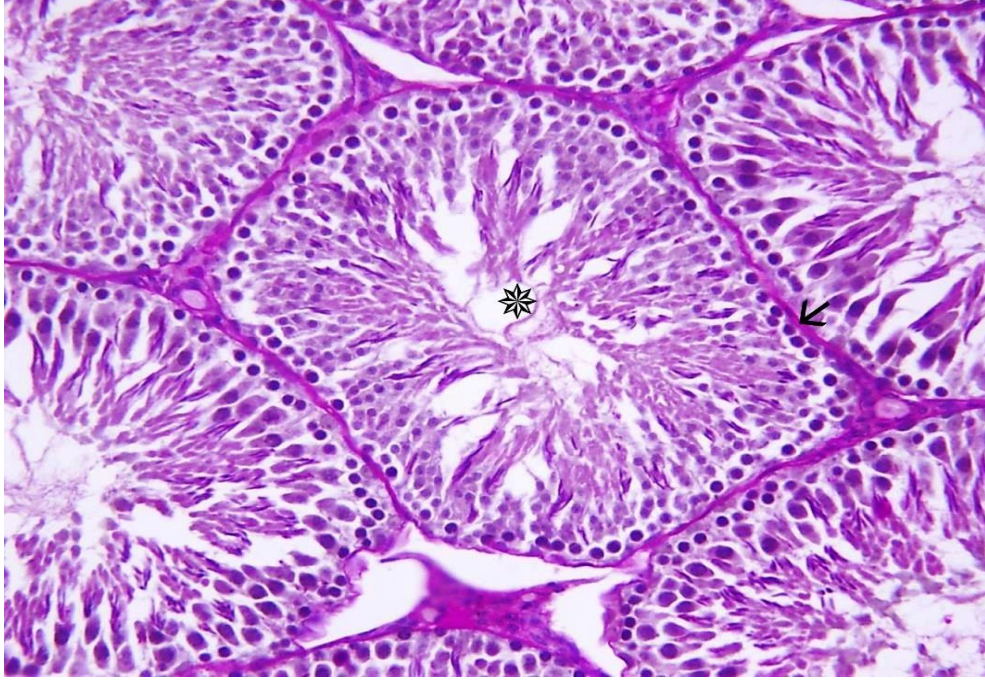
Şekil 16. Üçüncü gruba ait testis doku kesitinde PAS+HL boyanması, X400.



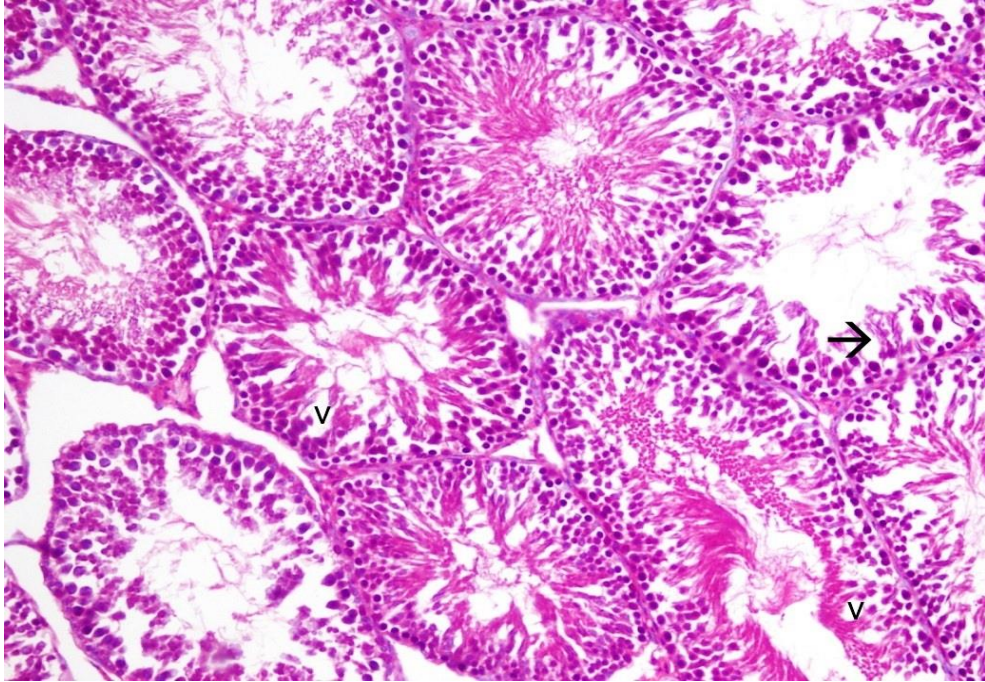
Şekil 17. Dördüncü grup seminifer tübüllerinin normale yakın çapta olduğu, farklı seviyelerde spermatogenez evrelerinin gözleendiği tübüller (→) ile aralarında yoğunluğu artmış interstisyel bağ doku (▴) izlenmektedir. H+E, X200.



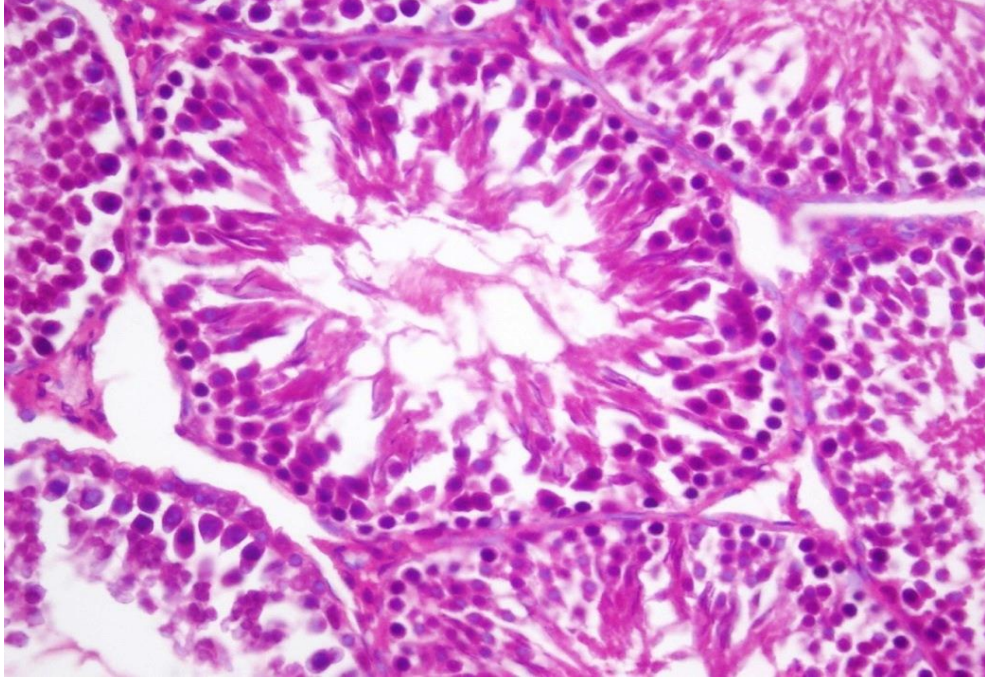
Şekil 18. Dördüncü gruba ait tübül duvarında tüm spermatogenik seri hücre diziliminin sırasına uygun şekilde yerleşmesi ve lümenlerin hepsinde spermelerin mevcut olması (*) dikkat çekmektedir. H+E, X400.



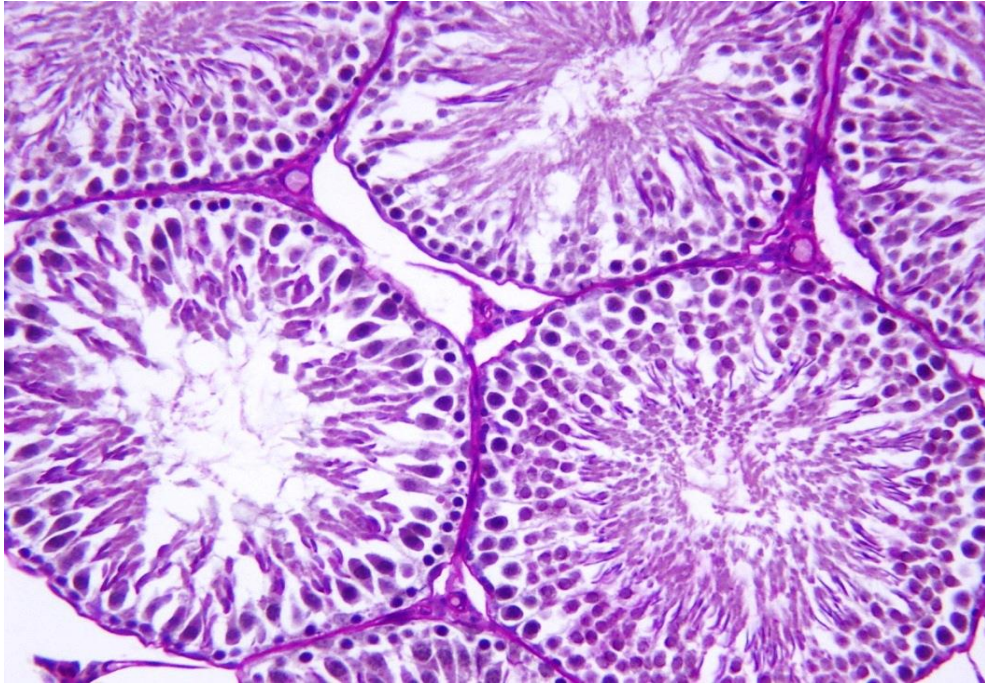
Şekil 19. Dördüncü gruba ait testis kesitinde PAS (+) reaksiyon vermiş bazal lamina (→) ile çevrili tübüllerde, tüm spermatogenik seri hücrelerinin mevcut olduğu (*) görülmektedir. PAS+HL, X400.



Şekil 20. Beşinci gruba ait mikrografta, seminifer tübüllerin çoğunda Sertoli hücreleri ve spermieride içeren spermatogenik seri hücrelerinin varlığı ile birlikte vakuolizasyonlar (V) ve hücreler arası bağlantılarda bozukluk izlenmektedir. H+E, X200.



Şekil 21. Beşinci gruba ait mikrografta, seminifer tübül lümeninde olgun spermatidlerin kuyrukları ve spermier bulunmasına rağmen, hücreler arasındaki bağlantılarda zayıflama ve kopmaların yanısıra, çok sayıda vakuolizasyonların varlığı dikkat çekmektedir. H+E, X400.



Şekil 22. JNK inhibitörü verilen 5. grupta PAS+HL boyanması izlenmektedir, X400.

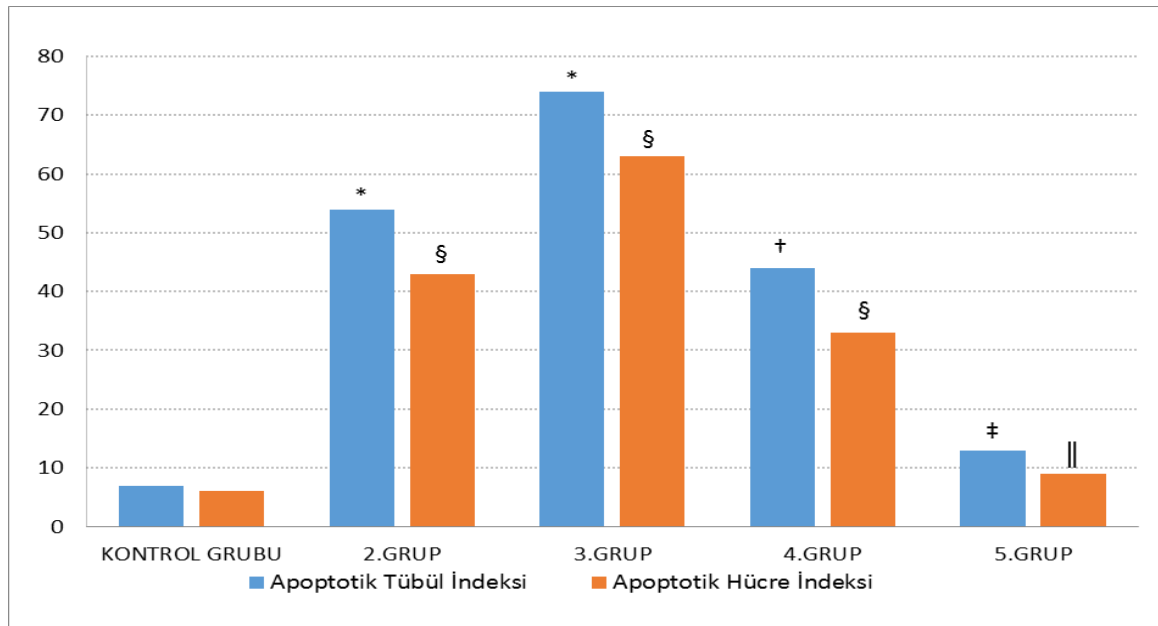
TUNEL immünreaktivite bulguları:

Kontrol ve diğer gruplardan alınan testis doku kesitlerinde bulunan apoptotik hücreler TUNEL metoduyla gösterilmiştir. Apoptozun değerlendirilmesinde, “apoptotik tübül indeksi” ve “apoptotik hücre indeksi” olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 2. grupta apoptotik tübül indeksi ve apoptotik hücre indeksi, anlamlı olarak artmıştır (P=0.021,P=0.020; Şekil 23,24). İkinci grup değerleri, 4. grup ile kıyaslandığında ise ne apoptotik tübül (P=0.773) ne de apoptotik hücre (P=0.248) indekslerinde bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 23,25).

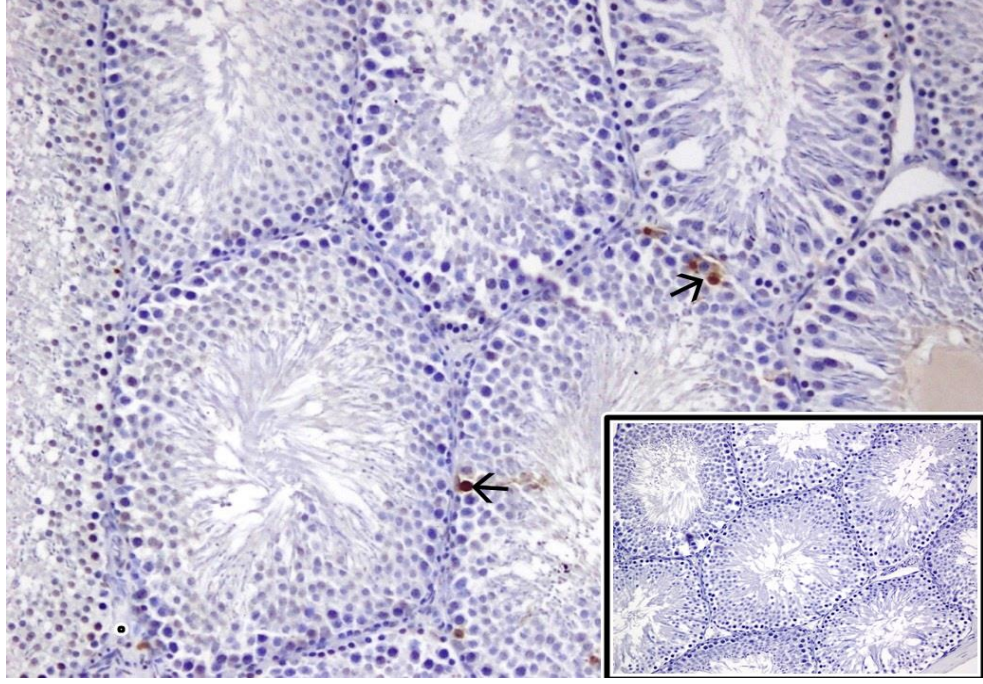
Üçüncü grupta ise apoptotik tübül ve apoptotik hücre indeksleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; herikisinin arttığı tespit edilmiştir (sırasıyla P=0.021; P=0.020; Şekil 23,27). Ancak JNK inhibitörü uyguladığımız 5. grup ile 3. grup değerlerini kıyasladığımızda; hem apoptotik tübül (P=0.021) hem de apoptotik hücre (P=0.020) indekslerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir.

Şekil 23: Apoptotik tübül ve hücre indeksleri tablosu

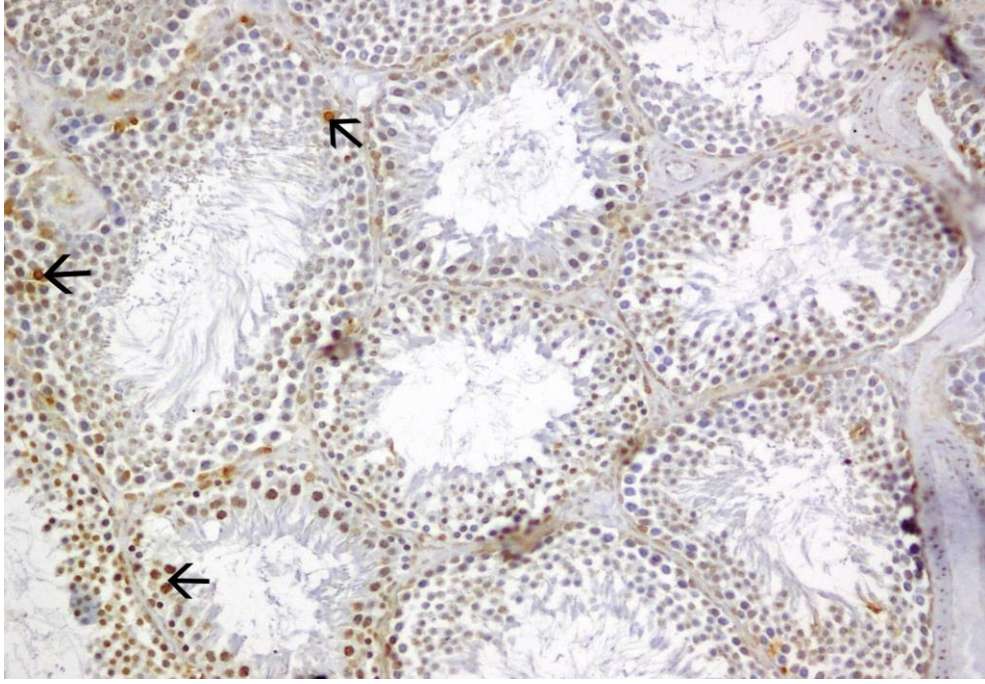


*:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P=0,021, †:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P=0,043, §: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P=0,020, ‡:3 grup ile karşılaştırıldığında P=0.021, ||:3. grup ile karşılaştırıldığında P=0.020

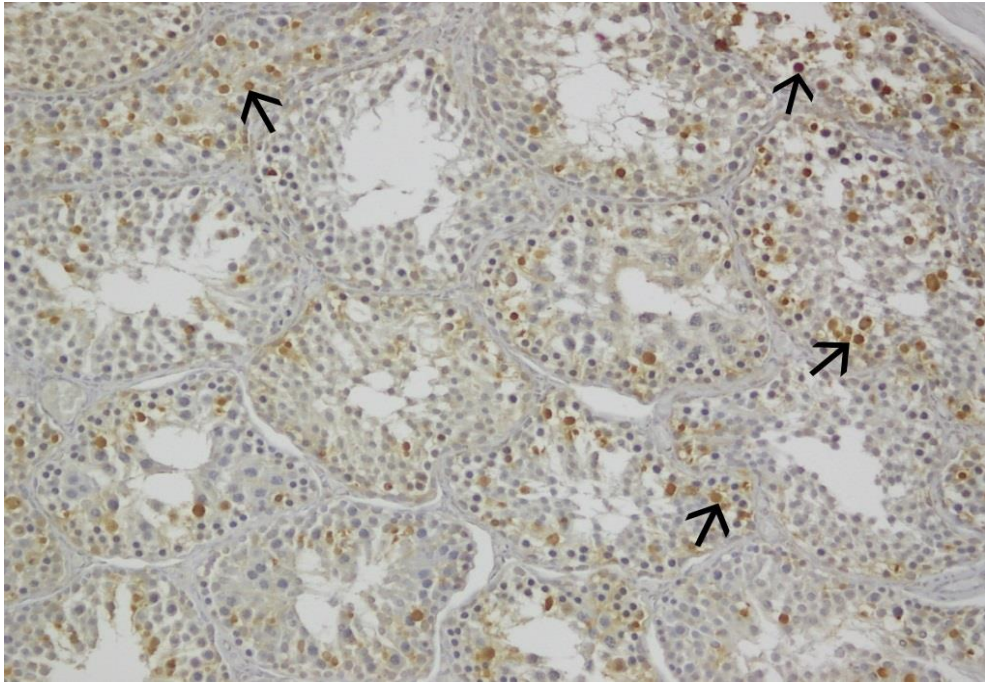
Kontrol grubu ile 4. ve 5. grup değerleri karşılaştırıldığında ise 4.grupta apoptotik tübül ($P=0.043$) ve apoptotik hücre ($P=0.020$) indeksleri belirgin olarak yüksek iken, 5. grup ile kontrol grubu arasında ne apoptotik tübül ($P=0.059$) ne de apoptotik hücre ($P=0.144$) indekslerinde bir farklılık tespit edilememiştir.



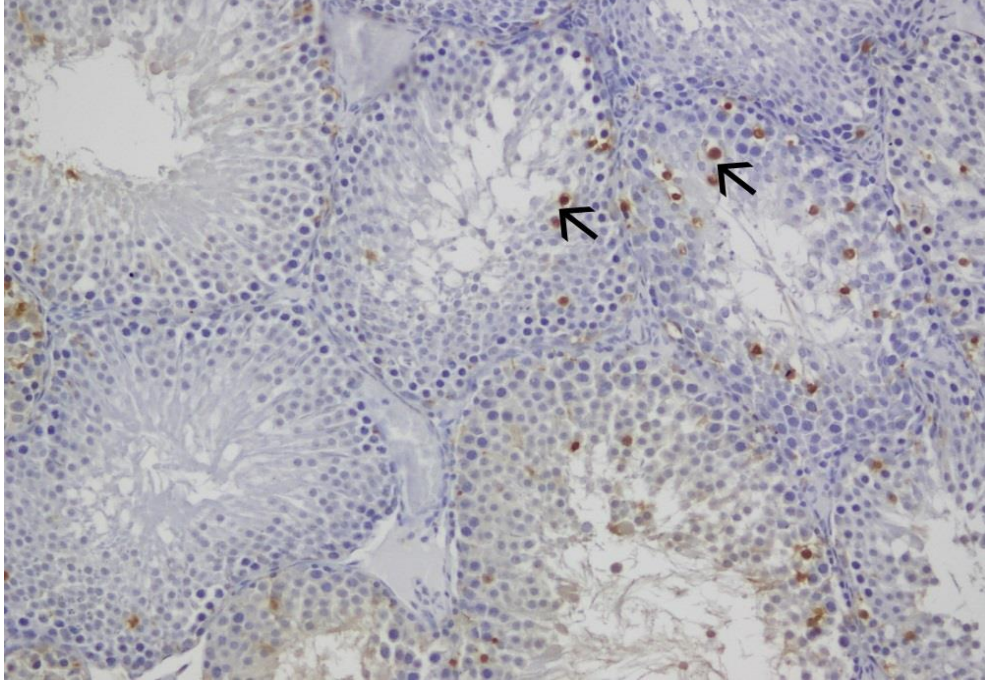
şekil 24. Kontrol grubuna ait mikrografta, az sayıdaki TUNEL(+) hücreler (→) izlenmektedir. Hematoksilen zit boyası, X200. İçsel şekil; negatif kontrol.



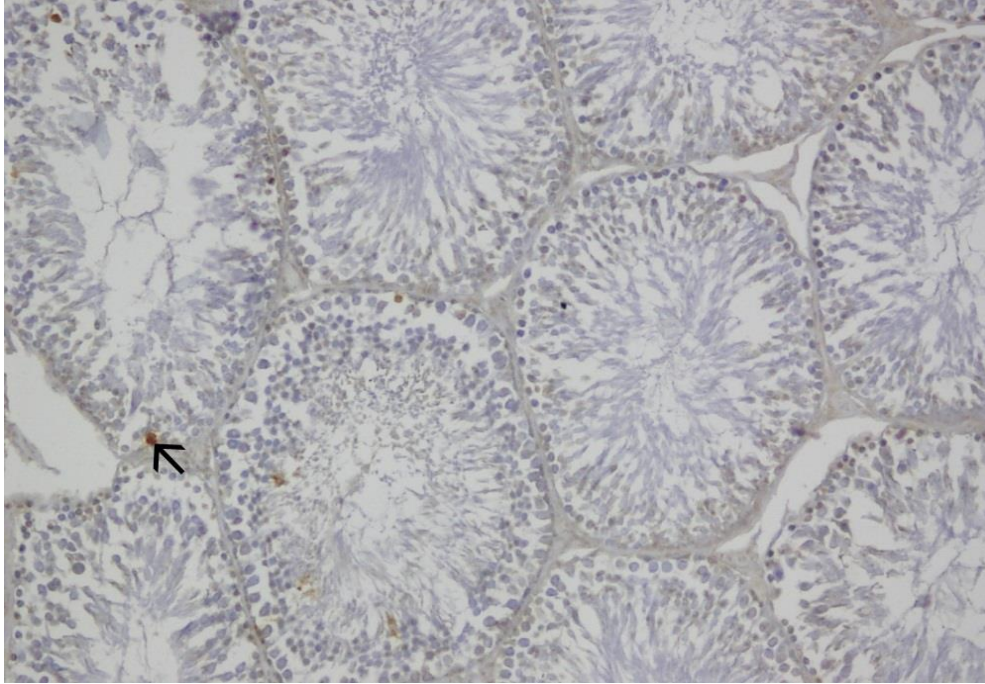
Şekil 25. İkinci gruba ait testis kesitinde TUNEL pozitif hücreler (→). TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 26.Üçüncü grupta çok sayıda TUNEL(+) hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 27. Dördüncü grupta seminifer tübül epitelinde, az sayıda spermatogonyumda (→) ve lümeneye yakın bazı hücrelerde TUNEL pozitif boyanma görülmektedir. TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 28. Beşinci gruba ait testis dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir, TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X200.

İmmunohistokimyasal Bulgular

Grupların testis dokularında fosfo(f)-JNK ve IL-6 immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için; her preparatta HSCORE yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 5' de özetlenmiştir.

Tablo 5. f-JNK ve IL-6 HSCORE değerlerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=8)	2. Grup (n=8)		3. Grup (n=8)		4. Grup (n=8)		5. Grup (n=8)	
		P		P		P		P	
f-JNK	84±16 (67-113)	136±31 (88-176)	0,003*	175±34 (124-218)	0,001*	92±11 (68-102)	0,248* 0,015†	95±16 (70-120)	0,141* 0,001†
IL-6	78±7 (73-90)	142±36 (84-186)	0,006*	183±30 (126-206)	0,004*	125±31 (76-172)	0,010* 0,337	116±14 (98-132)	0,004* 0,010†

*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: 3.grup ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

f-JNK immünreaktivite bulguları:

Tüm grupların f-JNK immünreaktiviteleri incelendiğinde; kontrol grubu testis dokusu seminifer tübüllerinde, hücresel lokalizasyonu nükleer olan, az sayıda immünpozitif hücre izlenmiştir. Kontrol grubunda, bazı spermatogonyum ve spermatozoid-lerde orta dereceli ve çoğunda ise hafif dereceli immünreaktivite gözlemlenmiştir (Şekil 29,30; Tablo 5).

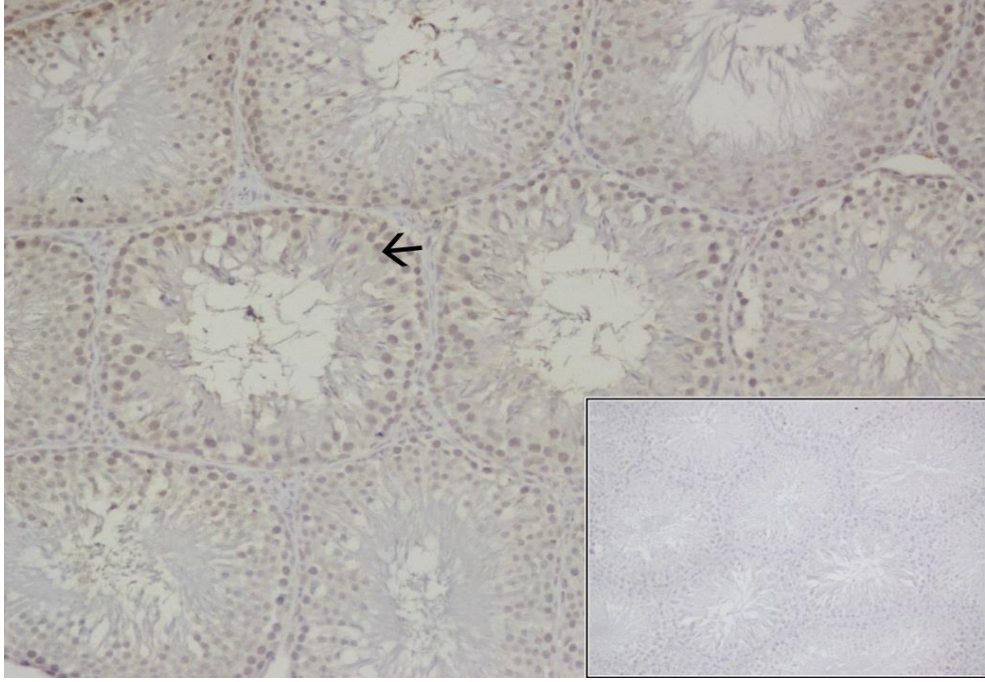
İkinci grupta ise, spermatogonyumların ve spermatozoid-lerin bir kısmında yoğun, bir kısmında hafif derecede immünreaktivite izlenmiştir (Şekil 31,32). İkinci grubun f-JNK HSCORE değerlerinin, kontrol grubu f-JNK HSCORE değerlerinden daha yüksek olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (P=0.003; Tablo 5). Bunun yanısıra, Sertoli hücreleri zayıf immünreaktivite göstermektedir (Şekil 32).

Üçüncü gruptaki testis doku örneklerinin seminifer tübül duvarlarında bulunan hücrelerin, diğer tüm gruplara göre daha yüksek bir HSCORE değerine

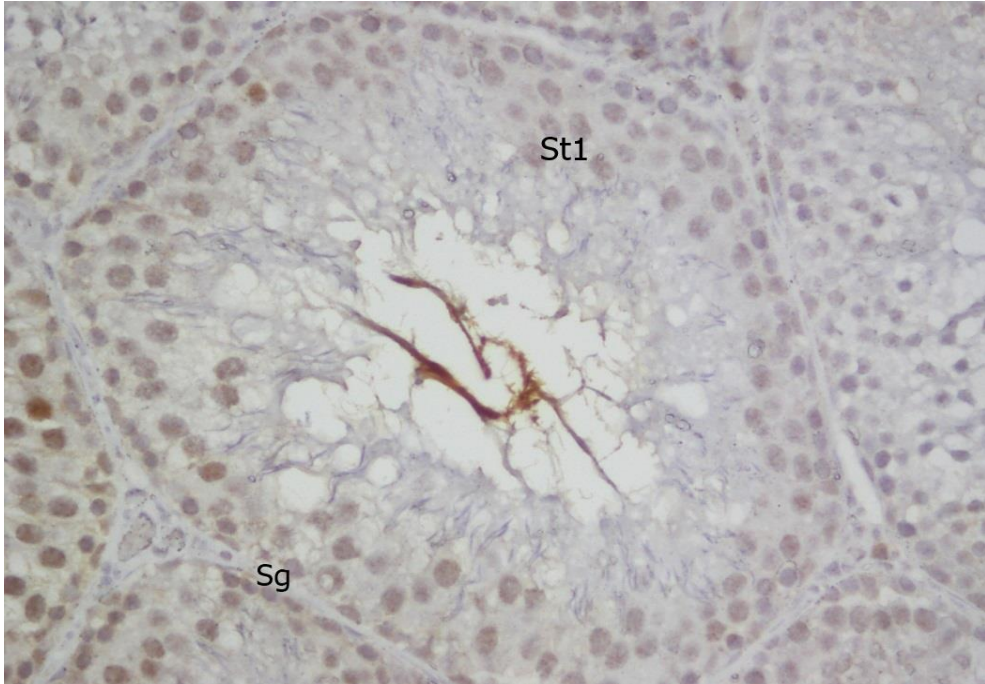
sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 33,34). Bu grupta HSCORE değerleri, kontrol grubu değerlerinden daha yüksektir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir (P=0.001; Tablo 5). Ayrıca bu grupta Sertoli hücrelerindeki şiddetli immunreaktivite dikkati çekmektedir (Şekil 34) .

JNK inhibitörü SP600125 verilen 4. grupta; bazı hücrelerde orta derecede reaktivite gözlenirken, bazılarında immunreaktivitenin oldukça düşük olduğu izlenmiştir. Spermatogonyumlarda hafif ve orta derecede reaktivite izlenirken; spermatozoidlerde farklı şiddetlerde immunreaktivite gözlemlenmiştir (Şekil 35,36). Sertoli hücrelerinde ise hafif derecede bir immunpozitiflik izlenmektedir (Şekil 38). Bu grubun HSCORE değerleri ile kontrol grubu değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken (P=0.248; Tablo 5); 2. grubun f-JNK HSCORE değerleri ile kıyaslandığında 4. grupta HSCORE değerinin belirgin olarak azaldığı ve aralarındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (P=0.015; Tablo 5).

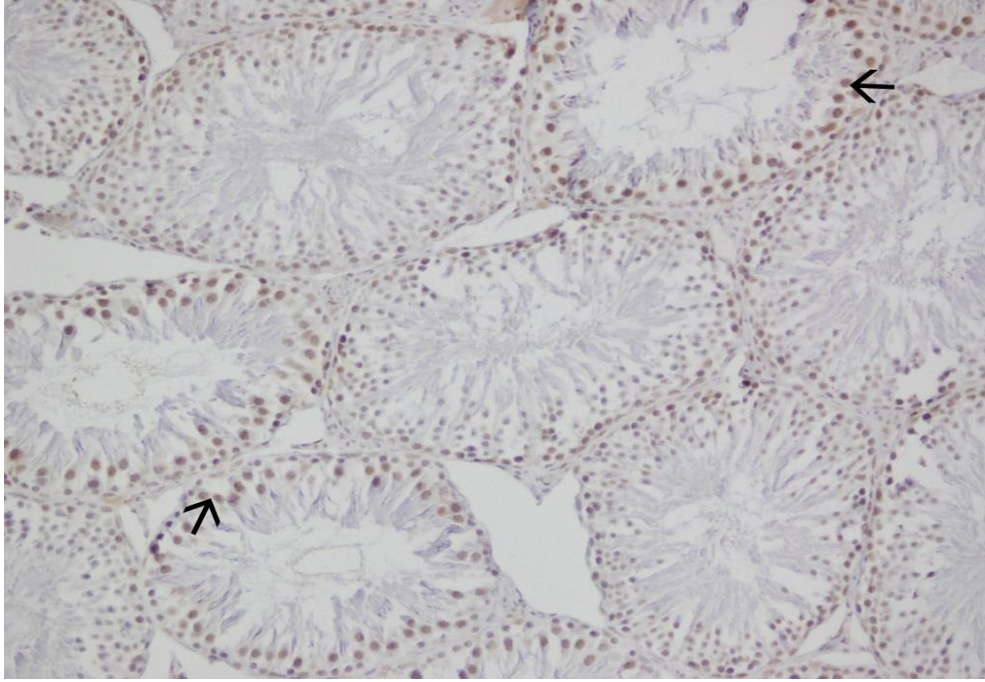
Beşinci grupta ise, spermatogenik seri hücrelerinde çoğunlukla orta ve hafif derecede immünreaktivite gözlemlenmiştir (Şekil 37,38). Sertoli hücrelerinde ise hafif bir reaksiyon izlenmiştir (Şekil 38). Bu gruptaki spermatogenik seri hücrelerinin HSCORE değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermezken (P=0.141; Tablo 5); bu grupta immunreaktivite azalmasının 3.gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu (P=0.001; Tablo 5) tespit edilmiştir. Bu durum aynı zamanda JNK inhibisyonunun gerçekleştiğinin de göstergesidir.



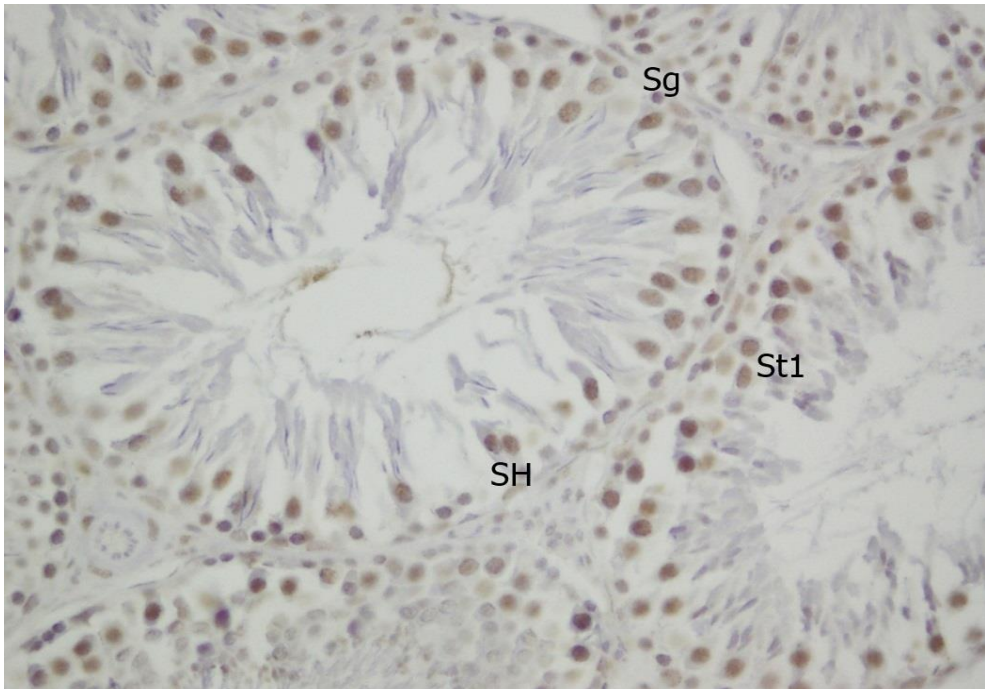
Şekil 29. Kontrol grubu testis kesitlerinde seminifer tübüllerde, f-JNK immünreaktivitesi (→) izlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X200. İçsel şekil; negatif kontrol, X200.



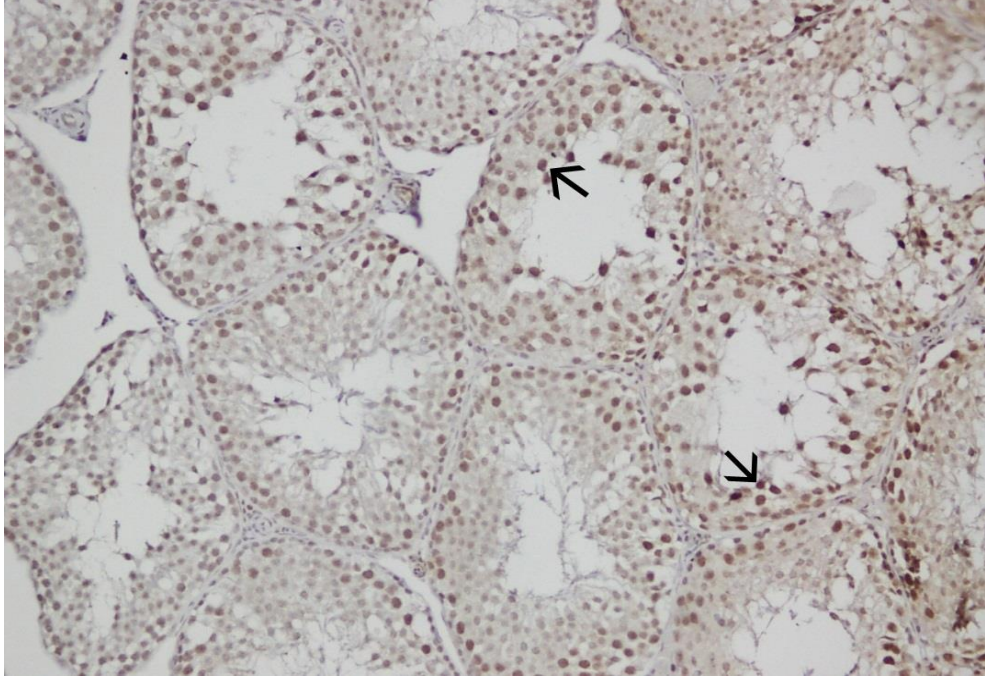
Şekil 30. Kontrol grubunda hafif ve orta derecede immünreaktivite gösteren az sayıdaki spermatogonyum (Sg) ve spermatosit-I (St1)'ler gözlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



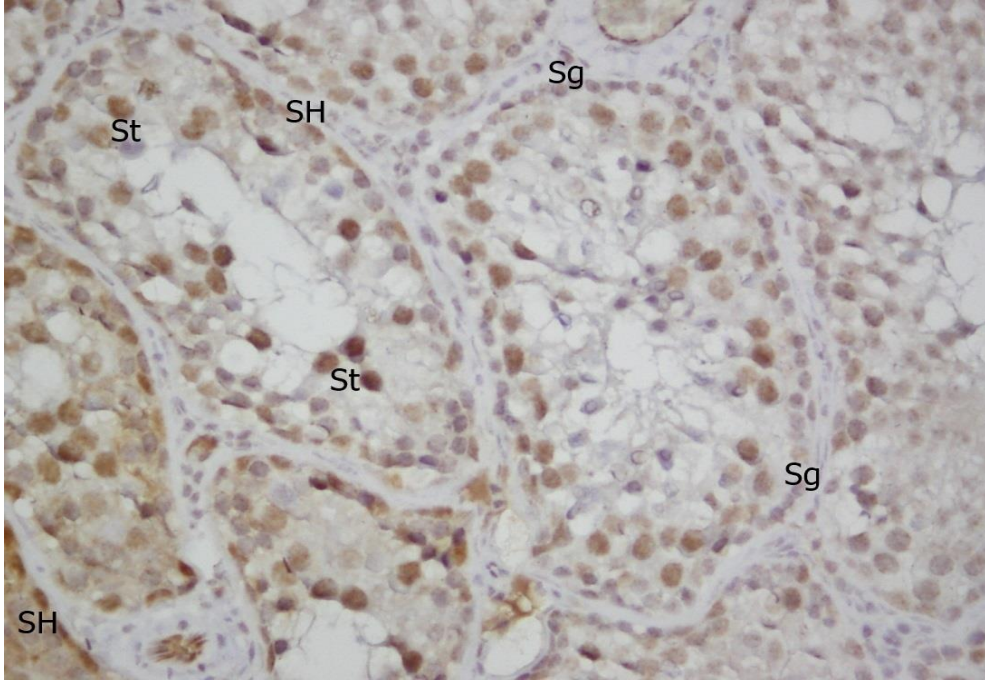
Şekil 31. İkinci gruba ait seminifer tübüllerde f-JNK immünreaktivitesi (→) gözlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



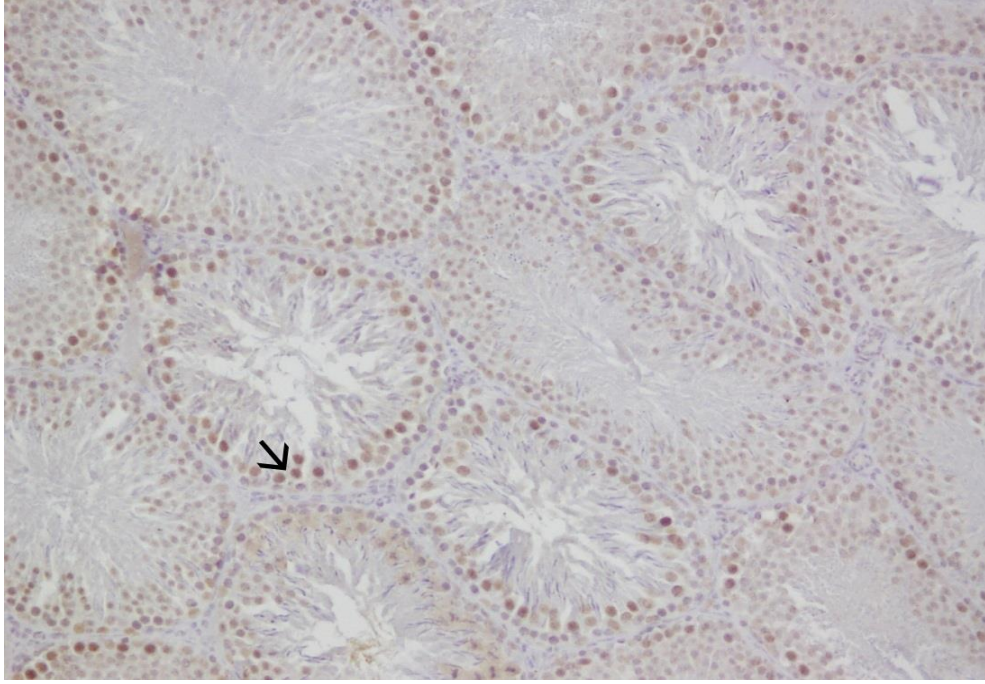
Şekil 32. İkinci gruba ait mikrografta, hafif derecede immünreaktivite izlenen Sertoli hücreleri (SH), spermatogonyumlar (Sg) ve orta derecede immünreaktivite gösteren spermatosit-I (St1)'ler izlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



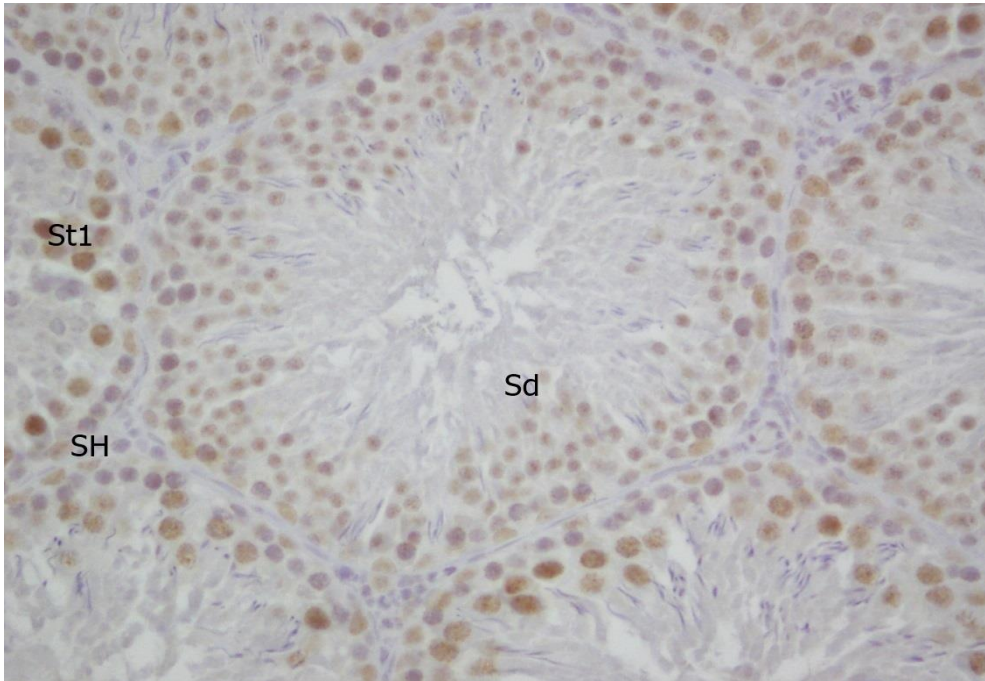
Şekil 33. Üçüncü gruptaki seminifer tübüllerde çoğunlukla şiddetli derecede immünreaktivite (→) gözlenmektedir. f-JNK, hematoksilin zıt boyaması, X200.



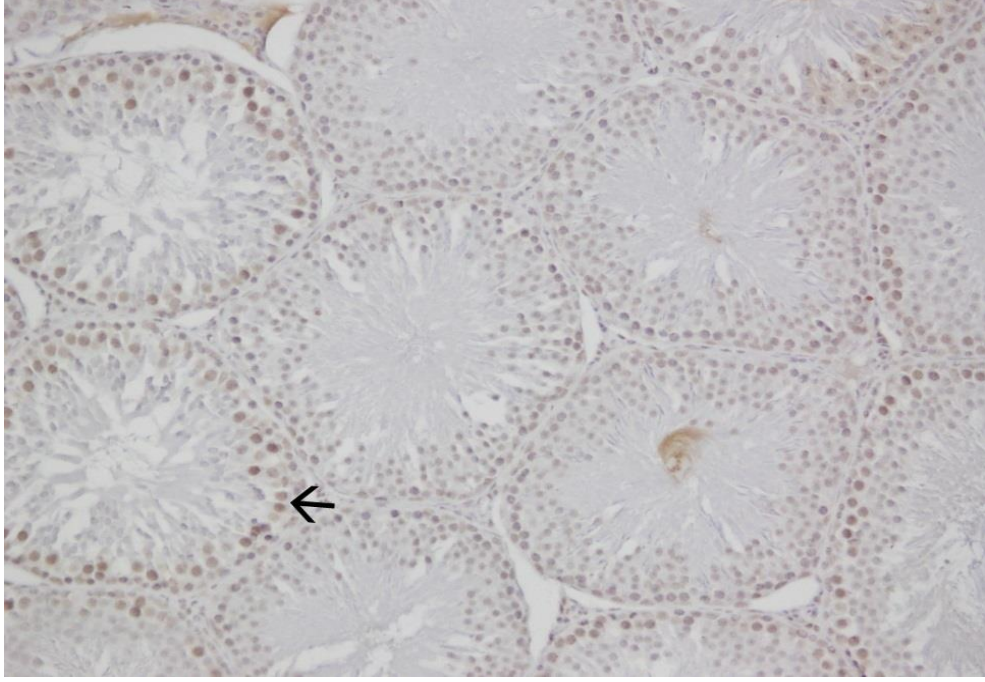
Şekil 34. Lümeneye atılmış, olgunlaşmamış germ hücrelerinin bulunduğu 3. grup seminifer tübüllerinde, spermatogonyumlarda (Sg) ve spermatozit'lerde (St), orta ve şiddetli derecede immünreaktivite izlenmektedir. Bazı Sertoli hücrelerindeki (SH) şiddetli immünreaktivite dikkati çekmektedir. f-JNK ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



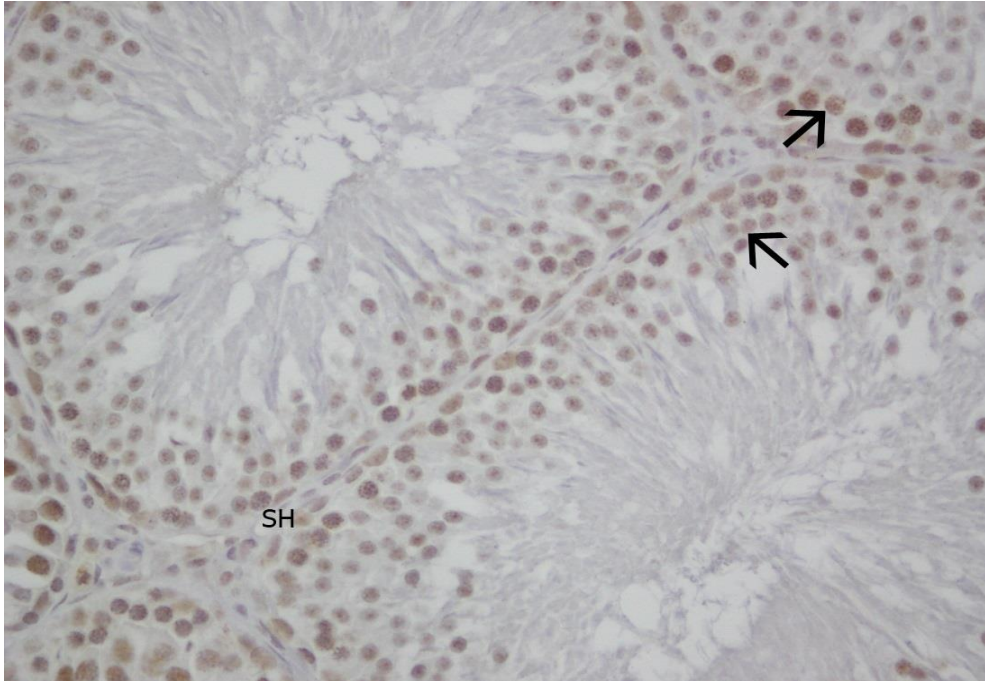
Şekil 35. Dördüncü gruba ait bu mikrografta, f-JNK immünreaktivitesi (→) gözlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 36. Dördüncü grupta spermatogonyumlarda genellikle hafif, spermatosit-I (St1)'lerde orta ve şiddetli immunreaktivite izlenirken, spermatidlerde (Sd) ve Sertoli hücrelerinde (SH) hafif derecede immünreaktivite gözlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



Şekil 37. Beşinci gruba ait mikrografta, f-JNK immunreaktivitesi (→) görülmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 38. Beşinci gruba ait bu mikrografta; farklı şiddetlerde immünreaktivite gösteren spermatogenik seri hücreleri (→) yanı sıra, Sertoli hücrelerindeki (SH) zayıf immünreaktivite izlenmektedir. f-JNK ve hematoxilen zıt boyaması, X400.

IL-6 İmmünreaktivite Bulguları

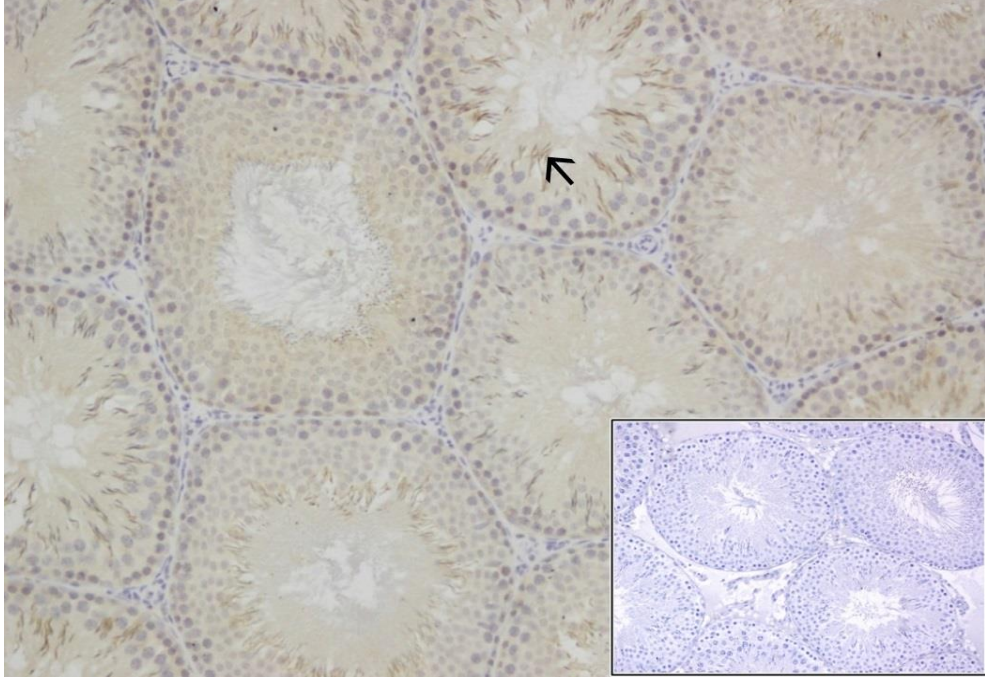
IL-6 immünreaktivitesi sitoplazmik olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubu testis seminifer tübüllerinde, özellikle spermatogonyumların bazal membrana dokundukları sahada ve çevresindeki sitoplazmik alanlarda hafif şiddette reaktivite gözlenmiştir (Şekil 39,40).

İkinci grupta ise; immunreaktivite daha şiddetli derecede izlenmektedir (Şekil 41,42). 2. grup HSCORE değerleri, kontrol grubu değerlerinden daha yüksektir ve aralarındaki fark da istatistiksel olarak anlamlılık taşımaktadır (P=0.006; Tablo 5). Ayrıca bazı tübüllerde Sertoli hücrelerindeki orta derecede izlenen immunreaktivite de dikkat çekici özellik göstermektedir.

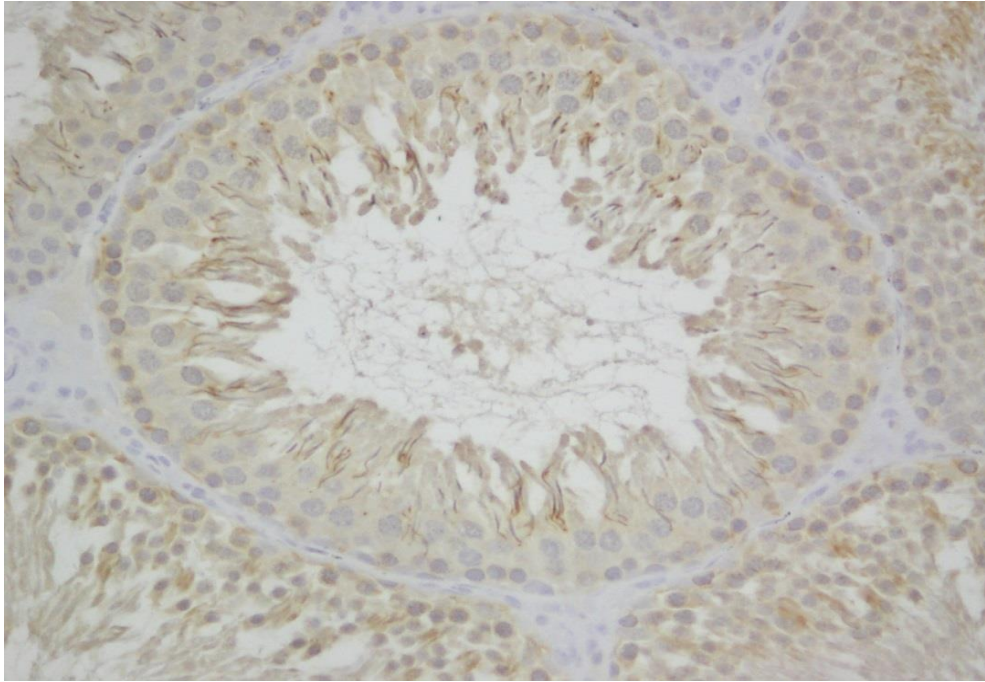
Üçüncü gruptaki sitoplazmik immünreaktivite, kontrol grubuyla kıyaslandığında; HSCORE değerlerinin daha yüksek olduğu ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği tespit edilmiştir (P=0.004; Tablo 5). Spermatogonyumlarda şiddetli, spermatosit-I ve spermatosit-II'lerde orta şiddette IL-6 immünreaktivitesi izlenmiştir (Şekil 43,44). Sertoli hücrelerinde ise orta ve şiddetli derecede immunreaktivite tespit edilmiştir. Bu reaktivitenin özellikle spermatonyumların ve Sertoli hücrelerinin bazal membrana temas ettikleri sahada ve spermatidlerde yoğun olduğu görülmüştür.

Dördüncü gruptaki IL-6 immünreaktivitesi ise spermatogonyumlarda orta derecede şiddetli, spermatosit-I ve II'lerde hafif şiddetli olarak izlenmiştir (Şekil 45,46). 4.grupta, kontrol grubuna göre yükselen HSCORE değerleri, istatistiksel olarak anlamlılık taşımaktadır (P=0.010; Tablo 5). Ancak 2.grup HSCORE değerleri ile aralarında bir fark bulunamamıştır (P=0.337; Tablo 5). JNK inhibitörü verilen bu grupta, Sertoli hücreleri hafif immünreaktivite sergilemektedir.

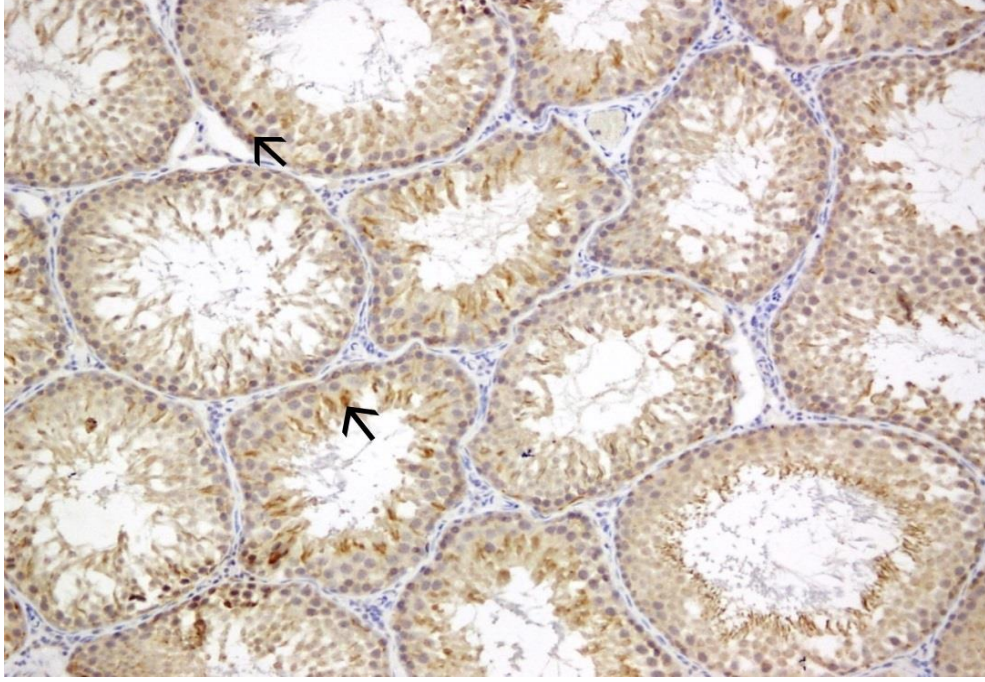
Beşinci grupta, 4. grup ile benzer olarak, sitoplazmada yer yer orta derecede olsa da genelde zayıf bir immunreaktivite tespit edilmiştir (Şekil 47,48). Kontrol grubuna göre, 5. grubun HSCORE değerleri de istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (P=0.004; Tablo 5). Ancak 3. grup ile 5. grup HSCORE değerleri açısından kıyaslandığında, 5. gruptaki değerlerin anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (P=0.010; Tablo 5). 5. grupta da Sertoli hücrelerindeki ekspresyonun oldukça zayıf olduğu belirlenmiştir.



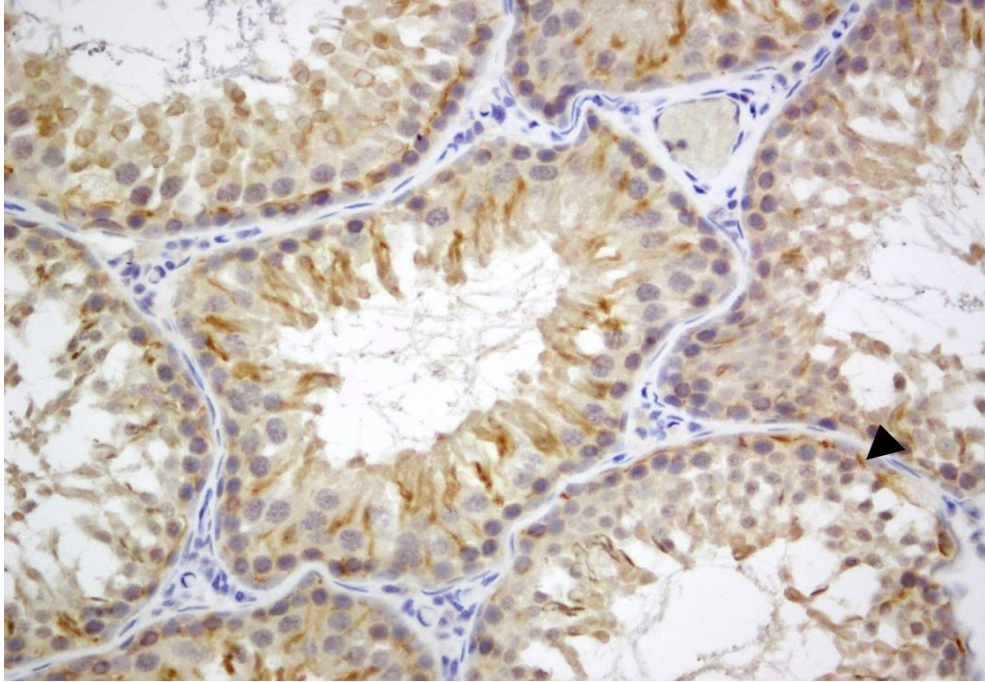
Şekil 39. Kontrol grubunda, bazı spermatogenik seri hücrelerinde immünpozitif reaktivite izlenmektedir(→). IL-6 ve hematoksilin zıt boyaması, X200. İçsel şekil; negatif kontrol.



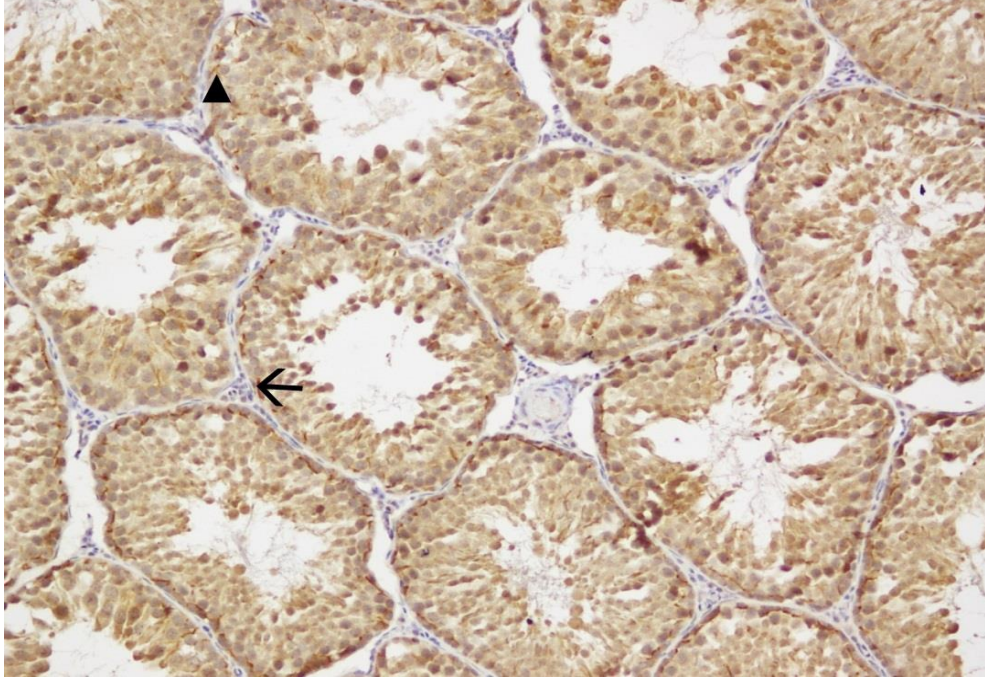
Şekil 40. Kontrol grubunda; spermatogonyumlarda, spermatositlerde, spermatidlerde ve spermelerde, hafif şiddette IL-6 immunreaktivitesi izlenmektedir. IL-6 ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



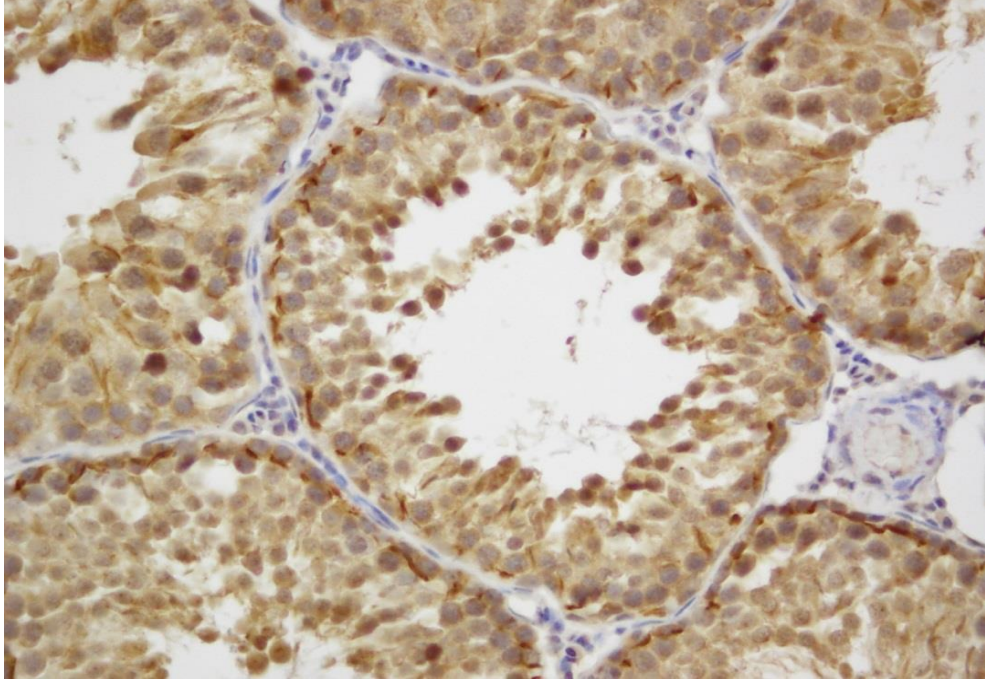
Şekil 41. İkinci grup testis dokusunda bulunan seminifer tübülerde, IL-6 immunreaksiyon şiddetinin arttığı görülmektedir(→). IL-6 ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



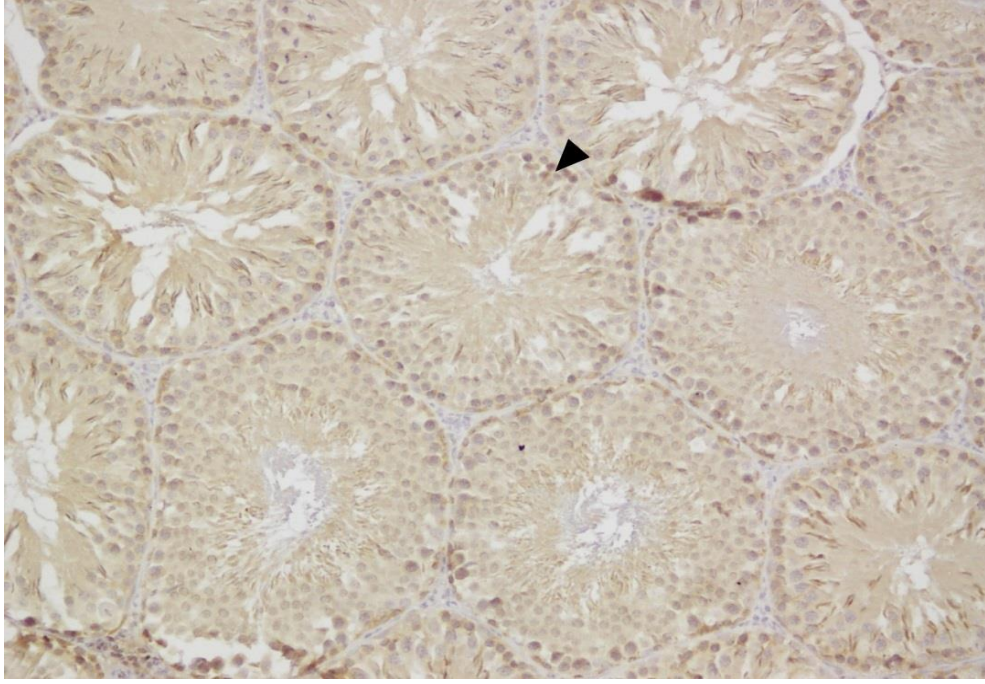
Şekil 42. Spermatogenik seri hücrelerinin çoğunda orta derecede şiddetli (►) immünreaktivite gözlenmektedir. IL-6 ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



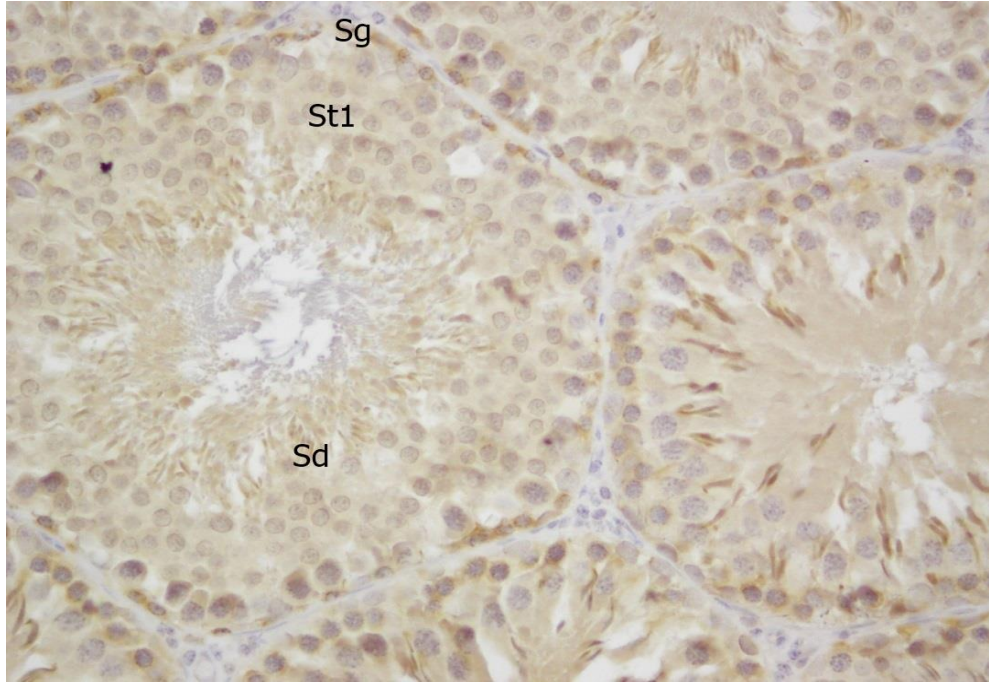
Şekil 43. Üçüncü grupta bazı seminifer tübüllerde şiddetli (→), bazılarında ise orta derecede şiddetli (▶) immünreaktivite görülmektedir. IL-6 ve hematoksilin zıt boyaması, X200.



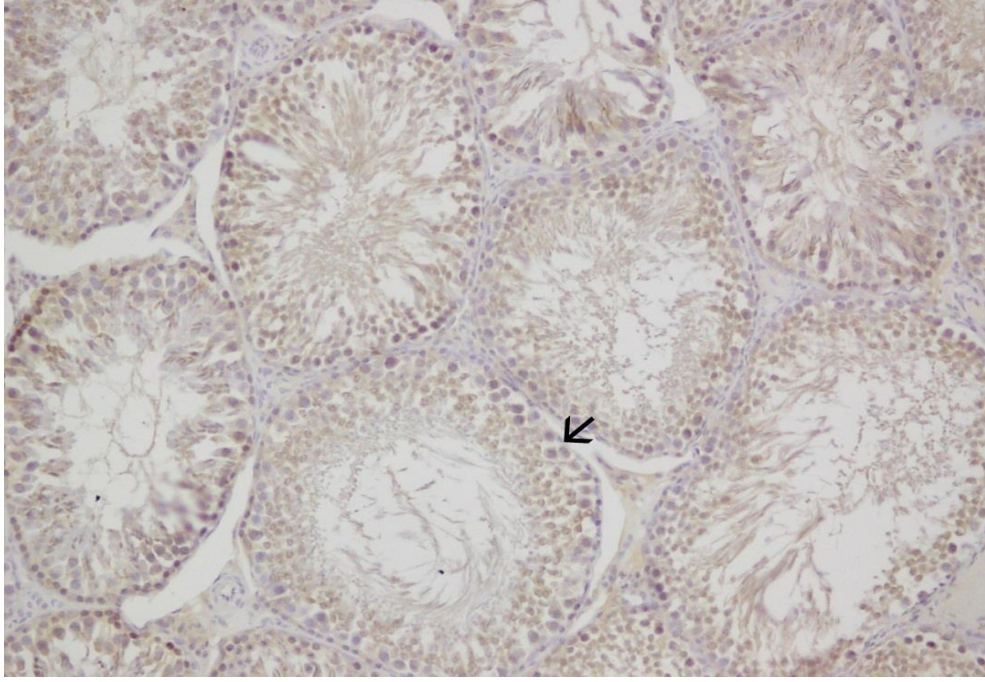
Şekil 44. Otuz günlük diyabet grubu seminifer tübüllerinde; sitoplazmik lokalizasyonlu, şiddetli derecede IL-6 immünreaktivitesi izlenmektedir. IL-6 ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



Şekil 45. Dördüncü gruba ait testis doku kesitinde, çapları birbirine yakın seminifer tübüllerde (►) IL-6 immünreaktivitesi izlenmektedir. IL-6 ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 46. Sitoplazmik olarak hafif derecede immünreaktivite gösteren, spermatogonyum (Sg), spermatosit-I (St1) ve spermatid (Sd)'ler izlenmektedir. IL-6 ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



Şekil 47. Beşinci grupta, seminifer tübüllerde bazı germ hücrelerinde hafif derecede immünreaktivite (→) gözlenmektedir. IL-6 ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



Şekil 48. Beşinci gruba ait spermatogenik seri hücrelerinin, hafif derecede reaktivite gösteren spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I (St1), spermatid (Sd) ve orta derecede reaktivite gösteren sperm (S) şeklinde sıralandığı gözlenmektedir. IL-6 ve hematoxilen zıt boyaması, X400.

TARTIŞMA

Tip 2 DM mortalite ve morbiditeye yol açan bir hastalık olup, komplikasyonlarının önemi nedeniyle günümüzün en büyük sağlık sorunlarından biridir. Diyabetin ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı bilinmesine rağmen, patogenezi hakkında halen açıklanılmayan noktalar mevcuttur. Ancak insülin direnci, oksidatif stres ve inflamasyonun diyabetin gelişiminde önemli etkileri olduğu bilinmektedir (11,87).

Diyabet çok iyi bilinen semptom ve komplikasyonlarının yanı sıra, erkek bireylerde sebep olduğu subfertilite ve infertilite olgularından ötürü son yıllarda üzerinde sıklıkla çalışılan konulardan birini teşkil etmektedir.

Diyabetin insanlarda ortaya çıkardığı değişimlerin, sıçanlarda oluşturulan deneysel diyabet modellerinde de izlenebildiği bilinmektedir (8,41) Deneysel diyabet modelleri oluşturmak için kullanılan yöntemlerden birisi, β hücrelerine toksik etkisi olan ajanların deneklere verilmesidir. Bu amaçla en sık kullanılan kimyasallar, STZ ve alloxandır. STZ genellikle 40–60 mg/kg dozlarda uygulanmaktadır (43). Çalışmamızda, STZ'yi 60 mg/kg ve tek doz olarak uyguladığımız deneklerin, kan glukoz düzeylerinin deney süresince 250 mg/dl'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlere sahip tüm denekler, diğer çalışmalarla da paralel olarak (18,22,88) diyabetik olarak kabul edilmişlerdir.

c-Jun N-terminal kinaz; c-jun fosforile eden, AP-1 transkripsiyon faktör komponenti olan serin/theronin protein kinazdır (46,89). c-Jun N-terminal kinaz, serbest yağ asitleri ve inflamatuvar sitokinler tarafından aktiveleştirilir ve insülin etkinliğini bozar (28). JNK'nın terapötik inhibisyonu artrit, inflamatuvar kemik hastalıkları, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar, Parkinson hastalığı, iskemik yaralanmalar, inme ve miyokardial inflamasyon gibi çeşitli hastalıklarda klinik yarar sağlamaktadır (46).

Chen ve ark. (90); sıçanlara STZ uygulandıktan 2 gün sonra, in vivo ultrason-hedefli mikrokabarcık hasarlama (ultrasound-targeted microbubble destruction- UTMD) yöntemini kullanarak, sıçan insülin promotör (RIP3.1) ve NeuroD1 gibi bazı genleri direkt olarak pankreasa aktardıkları yeni bir gen terapi modelinde, tedavi öncesinde SP600125 kullanımının, pankreas β hücrelerindeki apoptozisi engellediğini, hatta hücrelerin yenilendiğini ve kan glukoz düzeylerinin de 90 gün içinde normale döndüğünü ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda diyabet oluşturduktan iki gün sonra, SP600125'i 15 mg/kg i.p. uyguladığımız 4. ve 5. gruplarda JNK inhibitörünün, hiperglisemik durumu ortadan kaldırmaya yönelik bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Bizim SP600125'i uygulama yöntemimiz ile direkt hedef dokuya etkili Chen ve ark. (90) uyguladığı gen terapisi öncesi kullanımı arasında, sonuçlar açısından fark olması çok doğaldır. Diyabetik deneklere SP600125'in i.p. uygulanması sonrası, zaman ya da uygulanan doza bağlı olarak, kan glukoz düzeylerinde bir normalizasyon görülebileceği kanısındayız.

Erkek fertilitesi, spermatogonenezin devamlılığıyla mümkündür. Spermatogenezin devamlılığı, tübül içi kan akımındaki glukoz düzeyleriyle yakından ilişkilidir. Diyabetik testis dokusunda gerçekleşen, hiperglisemik ya da hipoglisemik değişimlerle seyreden glukoz dalgalanmaları, spermatogenezin sürekliliğini etkilemektedir (7,10,11).

Çalışmamızda, deneysel diyabet modeli oluşturularak diyabetin testislerde ortaya çıkardığı etkiler histolojik olarak literatürler bilgisiyle kıyaslanmadan önce, deney başlangıç ve sonu kilo farkları, testis/vücut ağırlık oranı, seminifer tübül çapları gibi morfometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Tüm deneklerin deney

başlangıcı ve sonu arasındaki vücut ağırlık farklarını kıyasladığımızda; kontrol grubu deneklerinde herhangi bir azalma izlenmezken, 3., 4. ve 5. gruptaki deneklerin vücut ağırlıklarının, anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (P=0.11, P=0.12, P=0.21; Tablo 4). Diyabet oluşturulan bu gruptaki vücut ağırlığıyla ilgili bulgularımız, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gerçekleştirilen çalışmalarla paralellik (88,91-93) göstermektedir. Ancak 2. gruptaki deneklerin vücut ağırlık farklarının azalması, kontrol grubuna kıyasla anlamlılık değeri taşımamaktadır. Bu durumun, diyabete maruziyet süresinin kısa olmasından kaynaklanmış olabileceği düşüncesindeyiz.

Koroğlu ve ark. (19) 2014 yılında yaptıkları çalışmada; kontrol grubuna kıyasla deneysel diyabet oluşturulmuş grupta, hem vücut hem de testis ağırlıklarının azaldığını tespit etmişler ve bulguları Koh (16,23), Shrilatha, Muralidhara (42), Bal ve ark. (94) tarafından da desteklenmiştir.

Diyabet gibi hastalık modeli çalışmalarında organ hasarını ortaya koymaya yönelik değerlendirmelerde; DM için önemli olan kilo kaybının, organ ağırlığındaki değişim ile oranlanarak kıyaslanması elde edilen diğer sonuçların anlamlılığını arttırmaktadır. Bu düşünceden hareketle, çalışmamızdaki tüm grupların testis/vücut ağırlık oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre, 2., 3., 4. ve 5. grupta önemli bir azalma tespit edilmiştir (P=0.001; P=0.002; P=0.006; P=0.011; Tablo 3). İkinci ile 4. gruplar (P=0.110; Tablo 3) ve 3. ile 5. gruplar arasında (P=0.164; Tablo 3) testis/vücut ağırlık oranlarında anlamlı bir fark olmaması ise uygulanan JNK inhibitörünün etkin sonuç doğurması için gerekli olan zaman ve doz miktarının yeterli olmadığını akla getirmektedir.

Diyabetik erkeklerde ya da STZ gibi ajanlar uygulanan deneysel diyabetik erkek deneklerde; LH, FSH ve testosteron düzeyleri belirgin olarak düşmektedir (7,10,95,88). Diyabetik erkeklerde testosteron düzeylerinde azalmanın meydana gelmesi, diyabete bağlı testiküler hasarın göstergelerinden birisidir. Daha önce diyabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda, Leydig hücre dejenerasyonu sonucunda testosteron düzeyinin düşmesine bağlı olarak; seminifer tübüllerde atrofi (19,20), germ hücre hasarı (5,19), hücrelerin proliferasyon yeteneğinin azalması (5,22), spermatogonyum ve spermatozoidlerde apoptoza giden hücre sayısında artış, sperm sayısında azalma (16,23), Sertoli-spermatid

bağlantılarında ayrışmalar, çok nükleuslu dev hücrelerin oluşumu (5,96), epitel lümeninin hasarlı hücrelerle tıkanması (5,20), germ, Sertoli ve Leydig hücrelerinde vakuolizasyonlar (19,20), mikrovasküler değişiklikler ile beraber interstisyel kompartmandaki ekstraselüler matrikste kollajen miktarında artış görülmüş ve tüm bunlar testiküler disfonksiyon oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (22) Bu değişimler diyabetik erkeklerde libido azalmasına, erektil disfonksiyona, sperm motilitesi ve semen volümünde azalmaya yol açmaktadır (19,93).

Deneyssel diyabet oluşturduğumuz 2. ve 3. grup deneklerin testis doku örneği kesitlerinde, diğer araştırmacıların gözlemedikleri bulgularla uyumlu ve 2. grupta nispeten daha az olarak; tübül duvarlarında invajinasyonlar, spermatogenik hücrelerde hasar ve hücreler arasındaki bağlantıların bozulması sonucunda birbirlerinden ayrılma, bazı tübüllerde germ hücre kaybı, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, apoptotik hücre sayısında artış, tübül lümenindeki sperm yoğunluğunda azalma olduğunu ve spermatidlerin birleşerek çok nükleuslu dev hücreleri ortaya çıkardıklarını tespit ettik. Ayrıca, intersitisyel alanda artış ve konjesyon histolojik incelemeler sonucunda elde ettiğimiz bulgulardır. Jedlinska-Krakowska ve ark. (53) testis dokusunda yaptıkları çalışmada, interstisyel bölgede, ekstraselüler matrikste ve konjesyonda gözlemedikleri artışı; perivasküler, intertübüler ve peritübüler fibrozis ile toksik maddelere karşı bir bariyerin oluşmasıyla ilişkilendirmişlerdir.

Çalışmamızda 2. ve 3. gruplara ait diyabetik testis dokularında ortaya çıkan bu değişimlerin, JNK inhibitörü SP600125 uyguladığımız 4. ve 5. gruplarda ise belirgin bir şekilde ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Bu bulgulara açıklık getirmek ve onaylamak için seminifer tübül çapı ölçümü, Johnsen skoru ve apoptotik indeksleme yöntemleri kullanılmış ve özellikle JNK inhibitörü uygulanan gruplardaki değişimler göz önünde tutulmuştur.

Diyabetin etkisiyle testis dokusunda birçok histopatolojik değişikliklerin ortaya çıkmasıyla ve özellikle spermatogonyal hücrelerin azalması sonucu seminifer tübül çaplarında ciddi değişimlerin ortaya çıktığı bilinmektedir (88,94). Bizim çalışmamızda da diğer araştırmalarla benzer olarak (22,88,91,93,94), kontrol grubu ile diyabetik olan 2., 3., 4 ve 5. grup deneklerimizin seminifer tübül

çap değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($P<0.001$, $P<0.001$, $P=0.012$, $P<0.001$; Şekil 6).

SP600125 uygulanan 4. ve 5. grup deneklerinde, onlarla aynı sürede diyabet etkilerine maruz kalan ancak bu ajanın uygulanmadığı 2. ve 3. gruplara kıyasla, seminifer tübül çap değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$, $P<0.001$; Şekil 6). Bu bulguyu pekiştirmek adına, diyabetin seminifer tübüllerdeki etkileri Johnsen skoru ile gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda (91,94) olduğu gibi, bizim çalışmamızda da diyabetik olan 2., 3. ve 4. gruplardaki Johnsen skoru ortalamaları, kontrol grubu ortalamasına göre azalmıştır ($P<0,001$; Tablo 4). Johnsen skoru ortalamalarındaki bu düşüş, diyabetin testis dokusuna verdiği hasarı histolojik olarak göstermektedir. Güneli ve ark. (91), diyabetik testis dokusundaki Johnsen skoru ortalamalarının düşük olmasını; diyabetiklerde, oksidatif stres mekanizmasının aktifleşmesi sonucunda hipotalamo-hipofiziyal-gonadal aksda değişimlerin ortaya çıktığını ve buna bağlı olarak testosteron düzeylerinin azalmasıyla, anormal spermatogenezin izlendiği ve ayrıca germ hücre apoptozisinin de indüklendiği görüşlerini ileri sürmüşler ve farklı araştırmacılar tarafından bu görüşleri desteklenmiştir (11,94).

Bununla birlikte çalışmamızda, JNK inhibitör verilen 4.ve 5. grup Johnsen skoru değerlerinde; aynı süre diyabet etkilerine maruz kalan ancak bu ajanın uygulanmadığı 2. ve 3. gruplara kıyasla tespit edilen anlamlılığa çok yakın (2. ve 4. grup için $P=0.057$; Tablo 1) ve anlamlı (3. ve 5. grup için $P=0,01$; Tablo 1) artışın; JNK inhibitörünün etkisiyle, JNK yolağının baskılanması sonucunda, spermatogenezin doğal sirkülasyonunun devamlılığıyla ortaya çıkmış olabileceği kanaatindeyiz.

Seminifer tübül çaplarında ve Johnsen skora sonuçlarında tespit edilen, özellikle JNK inhibisyonu uygulanan diyabetik gruplardaki bulgularımızı açıklamamıza yardımcı olacak bir diğer bulguda, apoptotik hücre ve apoptotik tübül indeksleridir. Bu amaçla yapılan kontrol ve diyabet gruplarındaki apoptotik hücre ve tübül indeksi verileri, bu konuda yapılmış daha önceki çalışmalarla da paralellik göstermektedir. Diğer çalışmalarda (16,19,23,50) olduğu gibi 2., 3. ve 4. grup deneklerin seminifer tübüllerindeki spermatogenik seriye ait TUNEL pozitif hücre sayıları, kontrol grubuna göre artmakla beraber; 3. gruptaki artışın histolojik

olarak gözlemlenen bulgularla da uyumlu olarak, daha fazla olduğu anlaşılmıştır (P=0,020; Şekil 25). Ancak 5. grupta, kontrol grubuna göre bir fark belirlenmemiştir (P=0.144; Şekil 25). Bu sonuçlar; 15 günlük diyabete maruziyetin doku hasarı açısından, daha hızlı geri döndürülebilir olduğunu ve JNK sinyal yolağının bloke edilmesiyle apoptotizise sebep olan sadece JNK yolağının değil, başka yollarından da baskılanmış olabileceğini ve böylece uzun süreli diyabet etkilerinin, özellikle apoptozis artışının, bu yüzden kontrole yakın sonuçlara neden olabileceğini düşündürmektedir.

İkinci ile 4. grup karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayıları açısından bir farklılığın olmaması (P=0.248; Şekil 5); ancak 3. grup ile 5. grup karşılaştırıldığında ise JNK inhibitörü verilen 5. grupta apoptotik hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalması da, bu düşüncelerimizi desteklemektedir.

Sigara inhalasyonundan 1 saat sonra SP600125 JNK inhibitörü verilen bir çalışmada, apoptoziste, mukus plaklarında ve sitokinlerde azalma olduğu bildirilmiştir (63). Başka bir çalışmada ise böbrek iskemi-reperfüzyonunda koruyucu ajan olarak JNK inhibitörü uygulanmış ve Fas ligand bağlantılı apoptotik yolağında baskılanabildiği ileri sürülmüştür (63).

Diyabetik birey veya deneklerde hipergliseminin, direkt ya da indirekt olarak serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu önemli miktarda arttırdığı; antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak, organizmada oksidatif stresle beraber komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (8,52,91). Oksidatif stres; prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıyla, ROS'un aşırı üretimi ya/yada defans mekanizmasının işlevini yitirmesi sonucunda oluşmaktadır (92). Oksidatif stres, mitokondri başta olmak üzere tüm hücre organellerinin ve DNA'nın zarar görmesine neden olmaktadır (42). Yüksek düzeyde ROS, iç ve dış mitokondriyal membranları bozarak mitokondriden sitokrom C salınımına ve kaspazları aktiveleştirerek, apoptozu indüklemektedir (97).

Doku hasarının ortaya çıktığı birçok dokuda JNK aktivasyonu gerçekleştiği bilinmektedir (63). Oksidatif stres gibi etkenlerin sonucunda da ROS aracılığıyla

JNK aktifleşir ve kaspaz aracılı apoptozda önemli bir mekanizma olarak yer alır (46,47,79).

Tip 1 diyabette otoimmün β hücre tahribatında JNK'nın önemli rol oynadığı öne sürülmüştür. Pankreas β hücrelerinde, oksidatif stres aracılığıyla JNK aktifleşir ve JNK'nın bu aktivasyonu insülin gen ekspresyonunu azaltmaktadır. JNK yolağının baskılanması ile β hücrelerinin oksidatif stresten korunduğu bilindiği için; sitokinler tarafından tahrip edilen β hücrelerinde, JNK yolağı inhibisyonunun koruyucu olduğu düşünülmektedir (35,48).

Tip 2 diyabetik farelerde; karaciğer, kas ve yağ dokuda JNK aktivasyonunun yükseldiği ileri sürülmüştür. Karaciğerde JNK yolağının baskılanması diyabet modeli açısından, hem insülin direnci, hem de glukoz toleransı üzerine olumlu etkiler sağlamaktadır (98). Hu ve ark. (28), tip 2 diyabette JNK aktivasyonunun, karaciğer ve yağ dokuda arttığını ortaya koymuşlardır.

Testiküler germ hücre apoptozisi, spermatogenezde önemli rol oynamaktadır (56). Diyabetik erkeklerde, testis dokusunda apoptotik indeksin arttığı bilinmektedir (12,16,23,88,95). STZ uygulanan sıçanlarda, Bax mRNA protein ekspresyonunun arttığı, mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı ve böylelikle testislerde apoptotik hücre ölümüne aracılık ettiği gösterilmiştir. Ayrıca farelerde diyabetin p53 ve p38 MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonu ile oksidatif stres artışına neden olduğu ve böylece testiküler apoptozisin indüklendiğini bildirilmiştir (88). Koh da yaptığı bir çalışmada (23), diyabetik grup testis dokusunda, JNK ve Bax sinyal yolaklarının aktifleşmesi sonucunda apoptozun arttığını gösterirken; bir diğer çalışmada (16) ise Bcl-2 protein ailesi ve Bad ve Bcl-xL etkileşimi ile diyabetik sıçan testis dokularında apoptotik hücre ölümünü ilişkilendirmiştir.

Bizim çalışmamızda da f-JNK düzeyi, 2. grup ve 3. gruplarda kontrol grubuna göre artmıştır (sırasıyla $P=0.003$ ve $P=0.001$; Tablo 5). Bu bulgu, 30 günlük diyabet sonucunda f-JNK immunreaktivitesini incelediğimiz bir başka çalışmamızın sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir (22). Kontrol grubu ile inhibitör uygulanan 4.ve 5. gruplar arasında ise f-JNK immunreaktivitesi

açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Diğer sonuçlarımızla desteklenen bu bulgunun, JNK inhibisyonunun nispeten gerçekleştiğinin bir göstergesi olduğu kanaatindeyiz.

Ayrıca özellikle 3. grup ile 5. gruplar karşılaştırıldığında ise inhibitör uyguladığımız 5. gruptaki f-JNK düzeyinin anlamlı derecede düşük olması (P=0.10; Tablo 5) yine JNK inhibisyonunun göstergesidir. Yapılan araştırmalar sonucunda diyabetik sıçan testis dokusunda JNK inhibitörü verilip, f-JNK düzeyini immünohistokimyasal olarak inceleyen herhangi bir *in vivo* çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak, Borst ve ark. (99), renal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturup, daha sonra i.p olarak 30 mg/kg 4 gün arda arda JNK inhibisyonu uyguladıkları çalışmalarında, JNK ekspresyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir (99). Çalışma sonuçlarımıza göre uyguladığımız inhibitörün, f-JNK ekspresyonunu bir ölçüde engellediğini düşünmekteyiz. JNK inhibitörü uyguladığımız 4. ve 5. gruplarda apoptozisin engellenmiş olduğunu, buna bağlı olarak da seminifer tübüllerde ve çevrelerinde bulunan interstisyel sahadaki histolojik organizasyonun normale yakın bir görünüme sahip olduğu belirlendi. Seminifer tübül çapları, Johnsen skoru, apoptotik hücre ve tübül indeksi bulgularımızı da bu sonuçlarla ilişkilendirmekteyiz.

Tip 2 diyabetin patogenezinde IL-6'nın rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, diyabetin komplikasyonlarının gelişiminde rol alan önemli bir sitokin olduğu bildirilmiştir. Tip 2 diyabetin başlangından yıllar önce, dolaşımdaki IL-6 düzeyinin yükseldiği ve bu yüzden IL-6 düzeyinin, gelecekte tip 2 diyabette bir ön belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (24).

İnterlökin-6'nın plazmada bulunma düzeyi, insülin direnci ile bağlantılı bulunmuş, ayrıca vücut ağırlığından bağımsız olarak da diyabet riskini arttırabileceği düşünülmüştür (25,98). Yüksek doz IL-6 verilmesi sonucunda, sağlıklı insanlarda insülin direnci gelişebileceği ileri sürülmüştür (98). Tip 2 diyabetli hastalarda, IL-6 ve CRP seviyelerinin yüksek bulunması, diyabetin patogenezinde inflamasyonun önemli bir faktör olduğunu bize kanıtlamaktadır (100).

Li ve ark. (24) yaptıkları çalışmada, U937 mononükleer fagositer hücrelerini kültür ortamında IL-6 ve yüksek glukoz maruz bırakmışlar ve IL-6 konsantrasyonuna bağımlı olarak, matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1) ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Bu hücrelerin, yüksek glukoz düzeyine maruziyet sonucunda ise; IL-6'nın MMP-1 sekresyonunu normal glukoz uygulanan hücrelere göre 2-3 kat arttırdığını ileri sürmüşlerdir. SP600125'in JNK inhibisyonu sonucunda, sadece IL-6 ilişkili MMP-1 sekresyonunu değil aynı zamanda bazal MMP sekresyon düzeyinide inhibe ettiği gösterilmiştir. Tüm bu bulgular sonucunda da, IL-6'nın MMP'yi JNK yolağı üzerinden etkilediği görüşüne varılmıştır.

İnterlökin-6, spermatogenez ve steroidogenezde, otokrin ve parakrin faktör düzenleyicisi olarak işlev görür. Testis dokusunda IL-6'nın, spermatogenezde spermatogonyum ve spermatositlerde mayotik DNA sentezini inhibe ettiği, Sertoli hücreleri tarafından salınan transferrin ve inhibini etkilediği ve ayrıca sperm yoğunluğunu azalttığı gösterilmiştir (26,73,102). Ayrıca IL-6, normal sıçan testis dokusundaki Sertoli hücresi sıkı bağlantılarını, MAPK14 sinyal yolağını bozarak tahrip etmektedir. Ancak IL-6'nın, normal dokuda kan testis bariyeri dinamiklerindeki rolünü düzenleyen moleküler mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır (73).

Seminal plazmada bulunan proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6 ile ROS üretimi arasında pozitif bir bağlantı olduğunu destekleyen gözlemler mevcuttur (101)

Nallela ve ark. (101) yaptıkları bir çalışmada, varikoselli infertil erkeklerde IL-6 ve ROS düzeylerini araştırmışlar ve varikoselli infertil erkeklerde IL-6 ve ROS düzeylerinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ve antioksidan kapasitenin de azaldığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlarla, IL-6 ve oksidatif stresin; infertilitenin oluşmasında etkin rol alabileceğini öne sürmüşlerdir.

Rival ve ark. (26) ise otoimmün orşitisli sıçan testis dokusunda, ELISA yöntemiyle inceledikleri IL-6 düzeylerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek

olduğunu tespit etmişler ve IL-6'nın germ hücre apoptozisinin indüklenmesinde etkili olabileceğini sürmüştür.

Seshadri ve ark. (102), 22-49 yaşları arasında olan 73 infertil erkekte semen analizi yapmışlar ve sonucunda da oligospermik, astenospermik, oligoastenospermik, azospermik obstrüktif ve germ hücre defektli grupta, normospermik gruba göre IL-6 seviyelerini önemli derecede yüksek bulmuşlardır.

Kushawa and Jena (88), STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabetik modelde; antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösteren telmisartanın testisler üzerine etkilerini hücresel hasar ve apoptozis açısından değerlendirmişlerdir. iNOS (Inducible nitric oxide synthase), NF-kB (Nuclear Factor kappa B), TNF- α , IL-6, kaspaz-3 ve f-ERK1/2 gibi moleküler belirteçlerin yanısıra, oksidatif ve nitrosatif hasarı değerlendirilmişler; oksidatif ve nitrosatif stres markılarıyla, sperm sayısı ve DNA hasarı arasında bir ilişki olabileceğini öne sürmüştür. Diyabetik sıçanlarda, western blot tekniğiyle iNOS, NF-kB, TNF- α , IL-6, kaspaz-3 ve f-ERK1/2 düzeylerinin arttığını ancak telmirsartan verilen grupta ise bu protein düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir (88).

Diyabetik testis dokukesitlerinde IL-6 ekspresyonunu incelediğimiz bu çalışmada; IL-6 immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre tüm diyabetik gruplarda yüksek olduğunu gözlemledik. Diyabetik olan 2. ve 3. gruplardaki yükselmenin, artan oksidatif strese bağlı olarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Üçüncü grupta diyabet süresine bağlı olarak da IL-6 ekspresyonunun daha da arttığı gözlemlenmiştir. Dördüncü ve 5. gruplardaki artışın ise JNK inhibitörü dozuna ve yeterli sürenin geçmemesine bağlı olarak ya da kan glukoz seviyeleri itibarıyla halen diyabetik olan bu gruplarda, IL-6 seviyelerinin yüksek olmasının normal karşılanabilecek bir sonuç olduğu kanısındayız. Aynı bağlantıyla, 2. ile 4. grup arasında da, IL-6 ekspresyonunda anlamlı bir farklılık olmamasını açıklayabileceğimiz düşüncesindeyiz.

Ancak bir ay süreyle diyabetin etkilerine maruz kalan 3. ve 5. gruplar, IL-6 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında, inhibitör verilen 5. grupta anlamlı düzeyde azalmanın tespit edilmesi; JNK sinyal yolağının inhibisyonuyla, dokuda

oksidatif stres mekanizmasının bir noktada engellenmiş olabileceği ve bunun sonucunda da IL-6 ekspresyonunun azalmış olabileceğini akla getirmektedir.

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan aşırı ROS üretimi; özellikle sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisinde hasara neden olarak erkek subfertilite/infertilitesinin etiyolojisinde rol oynayabilmektedir (50,94,95). Ancak, sinyal yollarından birisinin ya da birkaçının bloklanmasıyla bazı genlerin ve spesifik hücre fonksiyonlarının kontrolü yapılabilmektedir (24).

Diyabetik testis dokusunda görülen apoptoziste JNK MAPK sinyal yolağının önemli bir rolü olduğu düşüncesinden hareketle; diyabetik erkek sıçanlara JNK inhibisyonu uygulayarak, spermatogenik seri hücrelerindeki hasarlanmanın ve apoptozisin nasıl etkileneceğini, daha da önemlisi IL-6'nın bu olayda nasıl bir değişim göstereceğini görmeyi amaçladığımız bu çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz bulgular, JNK yolağının önemini doğrulamaktadır.

c-Jun N-terminal kinaz MAPK sinyal yolağının; diyabetik testis dokusunda ortaya çıkan değişimlere etkisinin SP600125'in değişik süre ve dozlarda kullanımıyla, farklı metodlarla da araştırılması gerektiği ve diğer apoptotik yollarla olan ilişkisinin karşılaştırılmasının önemli olduğu, ancak bu çalışmalar sonucunda diyabetik erkek hastalarda karşılaşılan subfertilite / infertilite olgularında, JNK MAPK sinyal yolağının baskılanmasına yönelik yeni tedavi protokollerinin geliştirilebilmesinin mümkün olabileceği kanısındayız.

SONUÇLAR

Diyabetik erkek subfertilite ve infertilitesi özellikle son yıllarda üzerinde çalışılan önemli diyabet komplikasyonlarından biridir. Literatürde JNK yolağının, diyabetik testis dokusunda ekspresyonunun arttığını ileri süren ve bu yolağın önemine dikkat çeken çalışmalardan hareketle planladığımız bu projede; genç erişkin 40 adet *Sprague Dawley* erkek sıçan kullanarak; kontrol (n=8), 2. grup (tek doz 60 mg/kg STZ i.p.,15. gün sakrifiye edilen grup ; n=8), 3. grup (tek doz 60 mg/kg STZ,30.gün sakrifiye edilen grup; n=8), 4. grup (tek doz 60 mg/kg STZ-15mg/kg SP600125 i.p.,15.gün sakrifiye edilen grup; n=8) ve 5. grup (60 mg/kg STZ-15mg/kg SP600125,30.gün sakrifiye edilen grup; n=8) oluşturulmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- 1- Tüm gruplardaki deneklerin deney başlangıç ve sonundaki ağırlık farkları kıyaslandığında; kontrol grubu ile 2. grup arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken (P=0.113), 3., 4. ve 5. gruplarda yeralan tüm deneklerde, kontrol grubuna göre anlamlı bir ağırlık kaybının meydana geldiği (sırasıyla P=0.002, P=0.001 ve P=0.004),
- 2- 2., 3., 4. ve 5. grup toplam testis ve vücut ağırlık oranlarıyla, kontrol grubu testis ağırlığı / vücut ağırlık oranları kıyaslandığında, anlamlı bir azalmanın olduğu (P=0.001; P=0.002; P=0.006; P=0.011),

- 3- Tüm deney gruplarının seminifer tübül çap değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmanın meydana geldiği (sırasıyla $P<0.001$, $P<0.001$, $P=0.012$, $P<0.001$), 3.grup ile 5. grup karşılaştırıldığında ise inhibitör verilen grup lehine anlamlı bir yükselmenin ($P=0.01$) olduğu,
- 4- Kontrol grubu ile 2., 3. ve 4. gruplar arasında, apoptotik tübül ve apoptotik hücre indeksleri karşılaştırıldığında; anlamlı artışın olduğu (2. ve 3. gruplar için $P=0.021$, $P=0.020$; 4. grup için $P=0.043$, $P=0.020$); 5. grupta ise 3. gruba göre apoptotik tübül ($P=0.021$) ve apoptotik hücre ($P=0.020$) indekslerinin düştüğü, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise ne apoptotik tübül ($P=0.059$) ne de apoptotik hücre ($P=0.144$) indekslerinde bir farklılık olmadığı,
- 5- Bütün grupların f-JNK HSCORE sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna göre; 2. ve 3. grup değerlerinin yükseldiği ($P=0.003$, $P=0.01$); ancak SP600125 verilen 4. ve 5. gruplarda ($P=0.248$, $P=0.141$); herhangi bir farkın bulunmadığı,
- 6- IL-6 immunreaktivitesinin ise 2.,3.,4. ve 5. gruplarda kontrol grubuna göre yüksek olduğu (sırasıyla $P=0.006$, $P=0.004$, $P=0.010$ ve 0.004), ancak 3. ile 5. gruplar kıyaslandığında, 5. gruptaki değerlerin anlamlı derecede azaldığı ($P=0.010$) sonuçlarına varılmıştır.

ÖZET

Bu çalışmada, diyabetik erkek infertilitesinde rolü olabileceği ileri sürülen JNK'nın inhibisyonu veya inhibisyonuz, hiperglisemiyle sinerjik bir etkileşimde bulunan IL-6 arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Sprague Dawley erkek sıçanlar kullanılarak; kontrol (n=8), 2. grup (tek doz 60 mg/kg streptozotosin i.p.,15 gün;n=8), 3. grup (60 mg/kg streptozotosin,30 gün;n=8), 4. grup (60 mg/kg streptozotosin -15mg/kg SP600125 i.p.,15 gün;n=8) ve 5. grup (60 mg/kg streptozotosin -15mg/kg SP600125,30 gün;n=8) oluşturulmuştur.

2.,3.,4. ve 5. grupların testis/vücut ağırlık oranlarında,kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma belirlenmiştir (P=0.001; P=0.002; P=0.006; P=0.011). Kontrol grubuyla karşılaştırılan, 2.,3.,4. ve 5. grup seminifer tübül çaplarının da azaldığı gözlenmiştir (sırasıyla P<0.001, P<0.001, P=0.012, P<0.001). 2. ile 4. grup ve 3. ile 5. gruplar karşılaştırıldığında ise inhibitör verilen gruplar lehine anlamlı bir yükselme (P<0.001) bulunmuştur. Tüm grupların Johnsen skor değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (P<0.001) ve 3.ile -5. gruplar karşılaştırıldığında ise 3. gruba göre anlamlı derecede artış (P=0.01) belirlenmiştir.

Apoptotik tübül ve apoptotik hücre indeksleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 2.,3. ve 4. gruplarda anlamlı olarak artarken (2. ve 3. gruplar için P=0.021,P=0.020; 4. grup için P=0.043,P=0.020); 5. grupta ise 3. gruba göre apoptotik tübül (P=0.021) ve hücre (P=0.020) indeksleri azalmıştır.

Bütün grupların fosfo- c-Jun N-terminal kinaz histolojik skorlama sonuçları incelendiğinde, kontrol grubu göre; 2. ve 3. grup değerlerinin yükseldiği (P=0.003,P=0.01); ancak SP600125 verilen 4. ve 5. gruplarda fark olmadığı görülmüştür (P=0.248,P=0,141).

İnterlökin-6 immunreaktivitesinin ise 2.,3.,4. ve 5. gruplarda, kontrol grubuna göre yüksek olduğu (sırasıyla P=0.006,P=0.004, P= 0.010 ve 0.004), ancak 3. ile 5. gruplar kıyaslandığında, 5. gruptaki değerlerin anlamlı derecede azaldığı (P=0.010) tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Testes, JNK, SP600125, IL-6.

TESTICULAR TISSUES OF EXPERIMENTAL DIABETIC RATS GENERATED JNK AND IL-6 RELATIONSHIP

SUMMARY

In this study, it is aimed to introduce the relationship between IL-6 which is synergistically interacts with hyperglycemia and inhibition or without inhibition of JNK which is suggested to have a role in diabetic male fertility.

Using *Sprague-Dawley* male rats, control (n=8), second group (single dose 60 mg/kg streptozotocin i.p.,15 days;n=8), third group (60 mg/kg streptozotocin,30 days;n=8), forth group (60 mg/kg streptozotocin –15mg/kg SP600125 i.p.,15 days;n=8) and fifth group (60 mg/kg streptozotocin -15 mg/kg SP600125,30 days;n=8) were assigned.

In testis to body weight ratios of second,third,forth and fifth groups, significant increase was observed in comparison to control group (P=0.001; P=0.002; P=0.006; P=0.011). The seminiferous tubular diameter of second, third, forth and fifth groups decreased when it was compared to control group (P<0.001, P<0.001, P=0.012, P<0.001,respectively). When the groups were compared pairwise –second group with forth group and third group with fifth group, there was a significant increase in favour of inhibitor injected groups (P<0.001). The Johnsen scores of all groups decreased significantly comparing to control group (P<0.001) while third and fifth groups were compared, it was defined a significant increase in fifth group in contrast with third group (P=0.01).

In consideration of apoptotic tubules and apoptotic cells indices; there is significant increase in second, third ve forth groups in comparison to control group(for second and third groups $P=0.021,P=0.020$; for forth group $P=0.043,P=0.020$); whereas there is a significant decrease in fifth group in apoptotic tubules($P=0.021$) and cell ($P=0.020$) indices in comparison to third group.

When phospho- c-Jun N-terminal kinaz HSCORE results of all groups were analyzed by comparison to control group; it was observed an increase in the values of second and third groups ($P=0.003,P=0.01$); but there is no difference in SP600125 injected forth and fifth gorups ($P=0.248,P=0,141$).

The interleukin-6 immunoreactivity of second,third,forth ve fifth groups in comparison to control group was higher ($P=0.006,P=0.004, P= 0.010$ ve 0.004 ,respectively), but when third and fifth groups were compared, the values in fifth group was observed as decreased significantly($P=0.010$).

Key words: Diabetes mellitus, Testes, JNK, SP600125, IL-6.

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Standards of medical care indiabetes. Diabetes Care 2014;37:14-39.
2. Türkiye diyabeti önleme ve kontrol programı eylem planı, <http://www.saglik.gov.tr/turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-programi>. (20.10.2014 tarihinde erişildi).
3. International Diabetes Federation. Diabetes atlas, 6th edition, 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas> (07.01.2015 tarihinde erişildi).
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004;27:1047-53.
5. Altay B, Çetinkalp S, Doganavşargil 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(2):828-31.
6. Dünyada ve Ülkemizde Diyabet. <http://www.hasuder.org.tr/hsg/=121> (01.08.2014 tarihinde erişildi).
7. Jain GC, Jangir RN. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. Pharmacogn Rev 2014;8(16):113-21.

8. Singh R, Kaur N, Kishore L, Gupta GK. Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. *J Ethnopharmacol* 2013;150(1):51-70.
9. Lamb RE, Goldstein BJ. Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. *Int J Clin Pract* 2008;62(7):1087–95.
10. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 2014;10(3):147-57.
11. 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.
12. Agbaje IM, Rogers DA, Mcvicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007;22(7):1871-7.
13. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Lanzafame F, Giammusso B, Vicari E. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. *Minerva Endocrinol* 2009;34(1):1-9.
14. Bener A, Al-Ansari AA, Zirie M, Al-Hamaq AO. Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus. *Int Urol Nephrol* 2009;41(4):777-84.
15. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 1997;49(4):508-513.
16. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-X_L and decreases the binding of pBad/14–3–3 in rat testis. *Life Sci* 2007;81(13):1079-84.
17. Zhao Y, Tan Y, Dai J, Li B, Guo L, Cui J et al. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicol Lett* 2011;200(1-2):100-6.
18. Trindade AA, Simões 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.

19. 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* 2014;63:47-54.
20. Cai L, Shali C, Evans T, Mukherje D, Chakrabarti S. Apoptotic germ cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res* 2000;28(5):342-7.
21. Qi S, Fu W, Wang C, Liu C, Quan C, Kourouma A et al. BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reprod Toxicol* 2014;50:108-16.
22. Dönmez YB, Kizilay G, Topçu-Tarladaçalışır Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testes. *Acta Cir Bras* 2014;29(10):644-50.
23. 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.
24. Li Y, Samuvel DJ, Sundararaj KP, Lopes-Virella MV, Huang Y. IL-6 and high glucose synergistically upregulate MMP-1 expression by U937 mononuclear phagocytes via ERK1/2 and JNK pathways and c-Jun. *J Cell Biochem* 2010;110(1):248–59.
25. Hassan W, Ding L, Gao RY, Liu J, Shang J. Interleukin-6 signal transduction and its role in hepatic lipid metabolic disorders. *Cytokine* 2014;66(2):133-42.
26. Rival C, Theas MS, Guazzone VA, Lustig L. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol* 2006;70(1-2):43-58.
27. Akyol G. İnterlökinler. *Mikrobiyoloji bült*; 1994;28:286-93.
28. Hu C, Su Q, Li F, Zhang G, Sun D, Han H et al. Duodenal-jejunal bypass improves glucose homeostasis in association with decreased proinflammatory response and activation of JNK in the liver and adipose tissue in a T2DM rat model. *Obes Surg* 2014;24(9):1453-62.
29. Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism* 2013;62(11):1543-52.
30. Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results

- of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002;25(9):1551-6.
31. Turkiyede-ve-bolge-ulkelerinde-diyabetsorunu.
<http://www.diabetcemiyeti.org/c/turkiyede-ve-bolge-ulkelerinde-diyabet-sorunu>. (05.05.2014 tarihinde erişildi)
32. 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.
33. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;18:1039-42.
34. Eisenbart G. Insulin autoimmunity: Immunogenetics/Immunopathogenesis of type 1A diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2003;1005:109-18.
35. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA. Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *Diabet Study* 2004;1(4):165-74.
36. Stoller JK, Michota FA, Mandell BF. *Diyabetes Mellitus: Kontrol ve Komplikasyonlar* (çeviri: A. Tuğrul). Demir AM (Editör). Cleveland klinik iç hastalıkları. İstanbul: İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz.Tic.Ltd.Şti; 2014. s.500-14.
37. Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Venemam T, Pangburn T, Reilly J et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 1992;326(1):22-9.
38. Bandello F, Pognuz R, Polito A, Pirracchio A, Menchini F, Ambesi M. Diabetic macular edema: classification, medical and laser therapy. *Semin Ophthalmol* 2003;18(4):251-8.
39. Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 1983;35(5):433-60.
40. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
41. İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004;2(3):127-36.

42. 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.
43. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. *Turk Jem* 2012;16:34-40.
44. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 2008;36(3):343-7.
45. Rashid K, Sil PC. Curcumin ameliorates testicular damage in diabetic rats by suppressing cellular stress-mediated mitochondria and endoplasmicreticulum-dependent apoptotic death. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(1):70-82.
46. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(24):13681-6.
47. Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem* 2010;285(28):21581-9.
48. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucosetoxicity. *Diabetes* 1999;48(12):2398-406.
49. Ok E, Öz ZS. Sperm hücrelerinde apoptoz. *Androloji bülteni* 2007;30:215-18.
50. Roessner C, Paasch U, Kratzsch J, Glander HJ, Grunewald S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reprod Biomed* 2012;25(3):292-9.
51. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250(1-2):66-9.
52. Altan N, Dincel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 2006;31(2):51-6.
53. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski AJ. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *Reprod Dev* 2006;52(2):203-9.
54. Doğan L, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:34-42.

55. Küçükkaya B, Afrasyap L. Mitojenle etkinleşen protein kinazların heterotrimerik G proteinleri ile düzenlenmesi. *Turk J Biochem* 2012;37(2):218–28.
56. Ranawat P, Bansal MP. Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: possible involvement of p38 and JNK MAPKs-in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 2008;309(1-2):21-32.
57. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes & Cancer* 2013;4:9-10.
58. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004;23(16):2838-49.
59. Çoban Dilşad Z, Güran Ş. Hücre içi sinyal ileti mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. *Cumhuriyet tıp derg* 2013;35:302-10.
60. Sehgal V, Ram PT. Network motifs in jnk signaling. *Genes Cancer* 2013;4(9-10):409-13.
61. Tournier C. The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. *Genes Cancer* 2013;4(9-10):397-400.
62. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22(2):153-83.
63. Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JNK no more? *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(1):76-93.
64. Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ, Barr RK. Targeting the JNKMAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697(1-2):89-101.
65. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116(2):205-19.
66. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004;73:87-106.
67. Anastakis D, Petanidis S, Kalyvas S, Nday CM, Tsave O, Kioseoglou E et al. Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2015;16(1):1691-710.
68. Oral HB. Kanser ve sitokin ilişkisi. 21.Ulusal Biyokimya Kongresi Özet Kitabı s.22, İstanbul, 2009.

69. Yılmaz Ö, Turgay N. Sitokinlerle ilişkili hücre içi sinyal iletimi ve paraziter enfeksiyonlardaki önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2009;33(4):301-6.
70. Baykal Y, Karaayvaz M, Kutlu M. İnterlökinler. *T Klin J Med Sci* 1998;18:77-81.
71. Kristiansen OP, Poulsen TM. Interleukin-6 and diabetes the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005;54(2):114-24.
72. Dalkılıç E, Gül CB, Alkış N. İnterlökin-6: İnflamasyonda başrol oyuncularından. *Uludağ Üniv Tıp Fak Derg* 2012;38(2):157-60.
73. Zhang H, Yin Y, Wang G, Liu Z, Liu L, Sun F. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci Rep* 2014;4:4260.
74. Kanemaki T, Kitade H, Kaibori M, Sakitani K, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, et al. Interleukin 1beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology* 1998;27(5):1296-303.
75. Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia Histochem Cytobiol* 2005;43(1):37-41
76. Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jégou B. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat Sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. *Endocrinology* 1997;138(7):2863-70.
77. Boockfor FR, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology* 1994;134(5):2150-5.
78. Potashnik H, Elhija MA, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E et al. Interleukin-6 expression during normal maturation of the Mouse testis. *Eur Cytokine Netw* 2005;16(2):161-5.
79. Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(4):420-5.
80. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52(3):812-7.

81. Saha SS, Ghosh M. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. *British Journal of Nutrition* 2012;108:974–83.
82. 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.
83. 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.
84. Yin Y, De Wolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998;58(2):492-6.
85. Hu JH, Jiang J, Ma YH, Yang N, Zhang MH, Wu M et al. Enhancement of germ cell apoptosis induced by ethanol in transgenic mice overexpressing Fas Ligand. *Cell Res* 2003;13(5):361-7.
86. Kizilay G, Cakmak H, Yen CF, Atabekoglu C, Arici A, Kayisli UA. Expression and regulation of c-jun n-terminal kinase (jnk) in endometrial cells in vivo and in vitro. *Histochemistry and Cell Biology* 2008;130:761-71.
87. Zhang Y, Ren M, Li J, Wei Q, Ren Z, Lv J et al. Does omethoate have the potential to cause insulin resistance? *Environ Toxicol Pharmacol* 2014;37(1):284-90
88. 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.
89. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23(5):599-622.
90. Chen S, Shimoda M, Wang MY, Ding J, Noguchi H, Matsumoto S et al. Regeneration of pancreatic islets in vivo by ultrasound-targeted gene therapy. *Gene Ther* 2010;17:1411-20.
91. 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.

92. 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.
93. 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.
94. Bal R, Türk 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.
95. Ballester J, Domínguez J, Muñoz MC, Sensat M, Rigau T, Guinovart JJ et al. Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. *J Androl* 2005;26(6):706-15.
96. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *Turk Klin J Med Sci* 2002;22:173-8.
97. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43.
98. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008;29(24):2959-71.
99. De Borst MH, Prakash J, Sandovici M, Klok PA, Hamming I, Kok RJ et al. c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331(3):896-905.
100. Gültekin D, Nartop F, Güvenen G, Aral H, Çürüksulu H, Arıkan Basaran N ve ark. Diyabetik ayak komplikasyonu bulunan ve bulunmayan DM’li hastalarda serum interlökin-6 ve hs-crp düzeyleri. *Haseki Tıp Bülteni* 2005;43.
101. Nallella KP, Allamaneni SS, Pasqualotto FF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A et al. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele. *Urology* 2004;64(5):1010-3.
102. Seshadri S, Bates M, Vince G, Jones DI. The role of cytokine expression in different subgroups of subfertile men. *Am J Reprod Immunol* 2009;62(5):275-82.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. STZ'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 2. MAPK sinyal yolağı	11
Şekil 3: JNK yolağının organizasyonu ve inhibitörleri	13
Şekil 4: IL-6 sinyal yolağı	15
Şekil 5: JNK'nın aktifleşme mekanizması	17
Şekil 6: Seminifer tübül çap değerleri	28
Şekil 7: Kontrol grubu, H+E, X100	34
Şekil 8: Kontrol grubu, H+E, X200	34
Şekil 9: Kontrol grubu, H+E, X400	35
Şekil 10: Kontrol grubu, PAS+HL, X400	35
Şekil 11: İkinci grup, H+E, X200	36
Şekil 12: İkinci grup, H+E, X400	36
Şekil 13: İkinci grup, PAS+HL, X400	37
Şekil 14: Üçüncü grup, H+E, X200	37
Şekil 15: Üçüncü grup, H+E, X400	38
Şekil 16: Üçüncü grup, PAS+HL, X400	38
Şekil 17: Dördüncü grup, H+E, X200	39
Şekil 18: Dördüncü grup, H+E, X400	39
Şekil 19: Dördüncü grup, PAS+HL, X400	40
Şekil 20: Beşinci grup, H+E, X200	40
Şekil 21: Beşinci grup, H+E, X400	41
Şekil 22: Beşinci grup, PAS+HL, X400	41

Şekil 23: Apoptotik tübül ve hücre indeksleri tablosu.....	42
Şekil 24: Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200	43
Şekil 25: İkinci grup, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200	44
Şekil 26: Üçüncü grup, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200	44
Şekil 27: Dördüncü grup, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	45
Şekil 28: Beşinci grup, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200	45
Şekil 29: Kontrol grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	48
Şekil 30: Kontrol grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	48
Şekil 31: İkinci grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200	49
Şekil 32: İkinci grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400	49
Şekil 33: Üçüncü grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200	50
Şekil 34: Üçüncü grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400	50
Şekil 35: Dördüncü grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	51
Şekil 36: Dördüncü grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	51
Şekil 37: Beşinci grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	52
Şekil 38: Beşinci grup, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	52
Şekil 39: Kontrol grubu, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	54
Şekil 40: Kontrol grubu, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	54
Şekil 41: İkinci grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	55
Şekil 42: İkinci grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	55
Şekil 43: Üçüncü grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	56
Şekil 44: Üçüncü grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	56
Şekil 45: Dördüncü grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X200	57
Şekil 46: Dördüncü grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X400	57
Şekil 47: Beşinci grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X200	58
Şekil 48: Beşinci grup, IL-6, hematoksilen zıt boyaması, X400	58

Tablolar

Tablo 1. Johnsen skorlaması	22
Tablo 2. Kan glukoz düzeyleri.....	26
Tablo 3. Ağırlık tablosu	27
Tablo 4. Johnsen skorlaması değerleri	29
Tablo 5. f-JNK ve IL-6 HSCORE değerlerinin karşılaştırılması	46

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Niğde'de doğdum. Ortaöğretimimi İstanbul Bağcılar Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 2002 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesinde lisans eğitimime başladım. 2007- 2010 yılları arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AnaBilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Halen aynı AnaBilim Dalı'nda doktora eğitimime devam etmekteyim. Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda 2013 yılından beri Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

EKLER

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAY BELGESİ

Araştırmanın Adı	Deneysel Diabet Oluşturulmuş Sıçanların Testis Dokularında JNK ve IL-6 İlişkisinin İncelenmesi
Araştırmanın Yürütücüsü	Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
Yardımcı Araştırmacılar	Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA Doktora Öğr. Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ
Kurumu	Tıp Fakültesi
Araştırmanın Tahmini Süresi	18 Ay
Kullanılacak Hayvan Türü ve Sayısı	Sıçan 50 Adet
Destekleyecek Kuruluş (lar)	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Proje Baskanlığı
Başvuru Tarihi	26/11/2012

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/01/... Tarih:17.01.2013
	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi /elemanı : ___ Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak ilgili başvuru belgeleri incelendi. Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna, projenin aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve proje yürütücüsüne iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması. 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar da değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması. 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihlerinin bildirilmesi. 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinden bulunulması. 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ETİK KURUL ÜYELERİ	
BASKAN Prof. Dr. İdris TÜREL	BASKAN YARDIMCISI Prof. Dr. Hasan ÜLKER
ÜYELER	
Prof. Dr. Murat DEMİREL	Prof. Dr. Duran BOLAT
Doç. Dr. Fazıl ŞEN	Doç. Dr. Ali İhsan ZENGİNGÜL
Doç. Dr. Sıddık KESKİN	Doç. Dr. Fatma İLHAN
Yrd. Doç. Dr. Fatih GARÇA	Yrd. Doç. Dr. Atilla DURMUŞ
Yrd. Doç. Dr. Barış Atalay USLU	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU
Vet. Hekim Yıldırım BAŞBUĞAN	Orhan SOFUOĞLU (Sivil Üye)

*Bu form YÜHADYEK tarafından doldurulacaktır.