

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

**Fas/FasL YOLAĞININ DİYABETİK ERKEK
İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Şinasi BAYRAM

EDİRNE – 2015

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

**Fas/FasL YOLAĞININ DİYABETİK ERKEK
İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Şinasi BAYRAM

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-2013/124

Tez No :

EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç.Dr.Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Şinasi BAYRAM tarafından tez başlığı "Fas/Fasl Yolağının Diyabetik Erkek İnfertilitesindeki Rolünün Değerlendirilmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı .../.../..... tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir

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

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

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE
Doç.Dr. Enis ULUÇAM

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

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

İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
DİABETES MELLİTUS	3
DENEYSEL DİYABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN	5
TESTİSLERİN ANATOMİSİ	6
TESTİSLERİN GELİŞİMİ	7
TESTİS HİSTOLOJİSİ	7
SPERMATOGENEZ	8
DİABETES MELLİTUS VE ERKEK İNFERTİLİTESİ	10
APOPTOZİS	11
FAS/FASL YOLAĞININ ETKİNLİĞİ	13
GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
IŞIK MİKROSKOBİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER	16
BULGULAR	19
TARTIŞMA	44
SONUÇLAR	49
ÖZET	51
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	55
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ	62
ÖZGEÇMİŞ	64
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FADD	: Fas-associated death domain
FasL	: Fas ligand
H+E	: Hematoksilen + Eozin
PBS	: Phosphate buffered saline
ROS	: Reactive oxygen species
STZ	: Streptozotosin
TNF	: Tumor necrosis factor
TNFR	: Tumor necrosis factor receptor
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), halk sağlığını tehdit eden önemli bir hastalıktır ve prevalansı her geçen gün hızla artmaktadır (1-3). Morbiditesi ve mortalitesi yüksek olan DM'nin başlıca komplikasyonları arasında; nefropati, nöropati, anjiyopati ve retinopati gelmektedir (4).

2013 yılı itibariyle, tüm dünyadaki diyabetik nüfusun yaklaşık 382 milyon olduğu ve bu sayının 25 yıl gibi bir sürede, 592 milyonu geçmesi beklenmektedir (5). Bunun başlıca nedenleri; yaşlanma, nüfus artışı, fiziksel inaktivite ve obezitenin artmasıdır (1,3,5).

Diyabetin; bazı organlarda sistemik komplikasyonlara neden olduğu bilinirken, erkek üreme sisteminde önemli bir etkisinin olmadığı düşünölmekteydi. Ancak bu görüş, son yıllarda yapılan araştırmalarla değişmiştir (1,6). Diyabet sebebiyle erkek bireylerde; erektil disfonksiyon, retrograd ejakölasyon, libido azalması, testosteron düzeyinde azalma, anormal spermatogenezis, sperm sayı ve hareketliliğinde değişiklikler, semen kalitesinde düşüş, özellikle testis dokusunda histopatolojik değişiklikler ve apoptozis ortaya çıkmaktadır (1,7). Deneysel diyabet oluşturulmuş erkek sıçanların testis dokularında görölen hücresel değişiklikler, DM'li insan testis dokularında görölen değişikliklere çok yakındır. Bu nedenle; sıçanlara uygulanan deneysel diyabet modelleri, DM'nin sebep olduğu semptomların ve komplikasyonların tedavisine yönelik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (6-8).

Diyabet sebebiyle, erkek ratların Leydig hücrelerinde görülen proliferasyon azalması (9) ve hücrel dejenerasyon, dolayısıyla hipotalamus-hipofiz-testis eksenindeki değişiklikler, testosteron seviyelerinde azalmayla sonuçlanmaktadır (10). Ayrıca DM; germ hücre apoptozisi aracılığıyla, anormal spermatogenezisin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (7,10).

Diyabetik erkeklerde, testis dokusundaki apoptozis mekanizmasına dahil olan çeşitli sinyal yolaklarının ve proteinlerin rollerine ilişkin çalışma sayısı azdır (7,8,11,12). Yapılan çalışmalar genellikle; diyabete bağlı olarak ortaya çıkan, erkeklerde subfertilite veya infertiliteye kadar gidebilen sonuçlar doğuran anormal spermatogenezin, çeşitli hormonlar ve antioksidanların kullanımıyla tedavi edilmesine yöneliktir (6,13).

Diyabetik erkek infertilitesinde etkili olabilecek apoptotik yolakların detaylı olarak araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz. Bu düşünceden hareketle; Fas/Fas ligand (FasL) sinyal yolağının, diyabetik erkek infertilitesindeki rolünün aydınlatılmasına ve böylece bu yolağın olası rolüne göre, inhibe edilmesine etken olabilecek çeşitli antioksidanların kullanımıyla, yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesine katkı sağlamayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

DİABETES MELLİTUS

Diyabet; pankreas beta (β) hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun eksikliğine ve bu hormonun kullanımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizma bozukluklarıyla seyreden, kronik hiperglisemi, hiperlipidemi ve aterosklerosis ile karakterize, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan bir hastalıktır (14-16).

Diyabet, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Diabetes Mellitus Uzmanlar Komitesi tarafından (16-18) şöyle sınıflandırılmıştır;

1- Tip 1 Diyabet veya İnsüline Bağımlı Diyabet

Pankreas β hücrelerinin, otoimmün yıkımı sonucunda ortaya çıkar. Yaygın olarak çocukluk ve erken yetişkinlik dönemlerinde görülmektedir. Tip 1 diyabetli hastaların büyük çoğunluğu (%90'dan fazlası), 30 yaş öncesinde teşhis edilir ve hastalık, genellikle çocukluk dönemlerinde başladığı için juvenil diyabet olarak da isimlendirilmektedir (16-21).

Tip 1 diyabetli bireyler, yaşamlarını sürdürmek ve ketozisten korunmak için, dışarıdan insülin desteğine ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle diyabetin bu tipine, "insüline bağımlı DM" de denilmektedir (16,18,22). Tip 1 DM'nin etiyolojisi ve patogenezi tam olarak bilinmese de, pankreastaki β hücrelerinin yıkımında, otoimmün nedenlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Otoimmün olmayan ve pankreas β hücre yıkımına ya da yetersizliğine sebep olan spesifik nedenler, tip 1 DM'yi kapsamaz (örneğin; mitokondrial defektler, kistik fibrozis vb gibi) (5,22).

2- Tip 2 Diyabet veya İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet

İnsülin salgısındaki kusurdan, insüline dirençten veya her ikisinin bir arada olmasından dolayı ortaya çıkan diyabet tipidir. Dünyada en sık rastlanılan diyabet türüdür. Tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ı tip 2 diyabetir (17,18). Genellikle 40 yaşından sonra teşhis edilir. Kötü beslenme alışkanlıkları, hareketsiz yaşam ve obezite gibi olumsuzluklar, tip 2 DM riskini arttıran faktörlerdir (17). Kan glukozu, plazma lipidleri, keton ve özel metabolitlerin ölçümü gibi parametreler klinik teşhiste oldukça önemlidir (17,20). Görme bulanıklığı, kilo kaybı, polidipsi ve poliüri, tip 2 DM'nin sıklıkla karşılaşılan klinik semptomlarıdır. En ağır semptomları ise, hiperosmolar nonketotik koma ve ketoasidozdur (17,22).

3- Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

İlk kez hamilelik esnasında teşhis edilen ve glukoz toleransının bozulması olarak tanımlanan diyabet tipidir (17). İnsülin eksikliği sonucu, hiperglisemi oluşmaktadır. Kadının gebe kalma yaşının 25'den büyük olması, ailede diyabetli öyküsü olması, gebelik öncesi kilo fazlalığı, önceki gebeliklerinde GDM veya glukoz toleransı bozukluğu tanısı almış olması ve gebelik sırasında kan-glukoz düzeylerinin yüksek tespit edilmesi GDM riskini arttıran faktörlerdir (18,23).

4- Sekonder Diyabet veya Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

Çeşitli genetik defektler, patolojiler, enfeksiyonlar, ilaç ve kimyasal ajanlara bağlı olarak ortaya çıkan diyabet tipidir. Aslında bu tip diyabet, öncesinde alta yatan genetik bir defekte sahip olan bir bireyde, bu defekte bağlı olarak ortaya çıkar. Diyabet hastalarının, çok düşük bir yüzdesini (%1'den az) oluşturur (18).

DENEYSSEL DİYABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN

Günümüzde çeşitli hastalıklara tanı konulması, hastalığa neden olan mekanizmaların aydınlatılması ve hastalıktan korunmak için sıklıkla, deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır (24). Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla genellikle; fare, sıçan, kobay, tavşan, maymun, kedi, köpek ve domuz gibi hayvanlar tercih edilmektedir. Deneysel diyabet bu türlerin kullanılmasıyla; kimyasal ajanlarla, spontan olarak veya virüsler aracılığıyla oluşturulmaktadır (25).

Streptozotosin; (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose)) deney hayvanlarında, hem tip 1 hemde tip 2 DM oluşturulmak için kullanılan bir kimyasal ajandır. *Streptomyces achromogenes*'den elde edilir (26). STZ'nin; antibiyotik, antitümoral, karsinojenik ve diyabetojenik etkileri bilinir. STZ, pankreas β hücrelerine doğrudan toksik etkilidir. Yapısında bir glukoz molekülü içerdiği için plazma membranındaki glukoreseptörlere bağlanır ve böylece insülin salınımını bloke eder ve ayrıca nükleer DNA üzerinde de etkilidir. STZ, hücre içinde reaktif karbonyum iyonlarını oluşmasına neden olarak, DNA'da alkilasyona sebebiyet verir. Bunu takiben, DNA tamir mekanizması devreye girerek, poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP)'ın hücre içinde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'i kullanmasına ve NAD⁺ depolarının boşalmasıyla, ATP içeriğinin azalmasına neden olur (24,27).

Krem rengi, toz halindeki STZ, -20°C'de karanlıkta saklanmalıdır. STZ, nötral pH'da dekompanse olurken, pH 4-4.5'da stabildir. STZ çözeltisi; uygulamadan hemen önce hazırlanmalıdır(27).

Deneysel diyabet oluşturmak için kullanılan STZ, üç fazlı bir biyokimyasal değişim süreci başlatır;

- 1) Geçici hiperglisemi fazı:** Karaciğerde ani glikojen yıkımının meydana geldiği bir fazdır. İki saat süren bu fazda, plazmadaki insülin düzeyi düşüktür.
- 2) Şiddetli hipoglisemi fazı:** Pankreasta bulunan β hücrelerinin dejenerasyonu ile birlikte, aşırı miktarda insülinin kana geçmesi ile oluşur. Kan-insülin düzeyi oldukça yüksektir. STZ uygulamasından yaklaşık 6 saat sonra başlar. İlk 24 saat içindeki ölümlerden, bu şiddetli hipoglisemi sorumludur.

- 3) **Kalıcı hiperglisemi fazı:** STZ uygulamasını takiben 10-12 saat içinde meydana gelir. Bu fazda, plazma insülin düzeyi düşer ve uzun süre bu düzeylerde seyreder (24).

TESTİS ANATOMİSİ

Erkek bireylerde bir çift olarak bulunan testisler, temel üreme organı olup; sitogenik fonksiyon olarak spermleri, endokrin fonksiyon olarak testosteron, inhibin vb gibi hormonları üretirler. Testisler insanlarda; yaklaşık olarak 2,5 cm genişliğinde, 4-5 cm uzunluğunda, 3 cm kalınlığında ve 10-15 gr ağırlığında olup, scrotum adı verilen bir kese içerisinde bulunurlar. Oval şekilli olan testislerin içinde bulunduğu scrotum, kıvrımlı bir deri kesesi şeklinde olup; iç yüzü, scrotal septum ile iki bölmeye ayrılır. Testisler, bu bölmelerdeki boşluklarda sağ ve sol testis olarak bulunurlar. Sol testis scrotum içinde, sağ testisten yaklaşık 1 cm daha distalde bulunur (28).

Her bir testis, anterior abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren ve scrotumun içerisine uzanan bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılı olarak bulunur. Testisler, spermatik kordonlar tarafından abdominal duvara bağlıdırlar (29).

Gebeliğin 26. haftasında testisler, abdomenden scrotuma inerler. Testisler, abdominal kavite ile scrotum arasındaki dar bir geçit olan inguinal kanaldan geçerler. İniş esnasında testisler, ana boşaltıcı kanalları olan duktus deferens ile beraberinde lenf damarlarını, kan damarlarını, otonomik sinirleri ve testislerin anterolateral yüzeyini kaplayan ve periton uzantısı olan tunica vaginalisi de sürüklerler (29).

Testisin kanlanması; aorta abdominalis'in bir kolu olan, arteria testicularis tarafından sağlanır. A. testicularis, mediastinumda birçok dala ayrılır ve septula testisleri izleyerek, organ içine dağılırlar. Testisin venöz kanını direne eden venler, önce pleksus pampiniformisi oluştururlar. Bu pleksustan çıkan iki ven daha sonra birleşerek, tek bir vena testicularisi oluştururlar. V. testicularis; sağda v. cava inferiora, solda v. renalis dökülür (28,30). Bu düzenlenme, kan damarları arasında ısı değişimine olanak sağlar ve testislerin düşük sıcaklıkta olmasına yardım eder. Testisten dönen soğuk venöz kan; zıt yönlü akım sıcaklık değişim mekanizmasıyla, arterial kanı testise girmeden önce soğutur. Bu şekilde scrotum içerisindeki sıcaklığın, normal vücut sıcaklığının 2-3 °C altında olması sağlanır (29).

Testisin lenfatik drenajı, nodi lymphatici preaortici'ye olmaktadır. Testis otonom sinirlerle innerve edilir. Sempatik ve parasempatik lifler, plexus testicularisi oluştururlar. Sempatik lifleri; medulla spinalis'in T10-12 segmentlerinden, parasempatikleri ise nervus vagus'tan köken alır (28,30).

TESTİSLERİN GELİŞİMİ

Testisler; genellikle normal bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda, 7.haftadan itibaren gelişmeye başlar. Y kromozomunun kısa kolundaki testis-belirleyici faktör (TDF) için cinsiyet belirleyici gen (SRY), farklılaşmamış gonadın testis yönünde gelişmesini sağlar. Transkripsiyon faktörü SOX9'un ekspresyonu, testiküler tayinde önemlidir. TDF; gonadal kordonları, farklılaşmamış gonadın medullasına doğru yoğunlaşması ve uzaması için stimüle eder. Çıkıntı oluşturan seminifer kordonların, yüzey epiteli ile olan bağlantısı, tunica albuginea geliştiğinde kaybolur. Testis daha sonra dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve mezorkiyum ile asılı kalır. Seminifer kordonlar; seminifer tübüllere, tübüli rekti ve rete testise dönüşür.

Seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel sahada yer alan Leydig hücreleri, embriyonal gelişimin sekizinci haftasında, mezonefrik kanalların ve dış genital organların farklılaşmasını uyaran, androjenik hormonlar salgılamaya başlarlar. Testosteron üretimi, embriyonik ve fetal gelişimin 8 ile 12. haftaları arasındaki dönemde en yüksek miktarlara ulaşan human koryonik gonadotropin (hCG) tarafından uyarılır. Fetal testisler ayrıca, Sertoli hücreleri tarafından müllerian inhibe edici madde (MIS) üretirler. MIS, paramesonefrik (Müller) kanallarının gelişimini engeller. Puberteye kadar solid halde kalan seminifer tübüllerin lümeni, puberteyle birlikte açılır. Duvarları Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşur (31, 32).

TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testisler dıştan üç katmanlı kalın fibröz bir kapsül tarafından kuşatılmışlardır. Bunlar; en dışta tunica vaginalis, ortada tunica albuginea, içte ise tunica vasküloza olarak adlandırılır. Tunica vaginalis; dışta pariyetal içte ise visseral tabakalardan oluşur. Kapsülün en kalın katmanı olan tunica albuginea, sıkı ve düzenli bir bağ dokudan oluşur. Tunica albugineanın iç kısımları kan damarlarından zengindir ve bu kısım tunica vasküloza olarak devam eder (29,33).

Kapsülden testis içerisine uzanan ince bağ dokusu uzantıları, testisi insanda sayıları yaklaşık 250'ye ulaşan lobüllere ayırır. Bu lobüller içerisinde, seminifer tübüller bulunur. Her testiste toplam uzunluğu 280-400 m arasında değişen 600-1200 seminifer tübül bulunur (34). Seminifer tübüllerin arasındaki sahayı, interstisyel bağ doku oluşturur. İnterstisyel bağ dokusu, kabaca intertübüler ve peritübüler alan olarak 2'ye ayrılır. İntertübüler alanda; testosteron üreten Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, sinirler, makrofajlar ve mast hücreleri bulunur (35). Leydig hücreleri; interstisyel bağ doku içerisinde, kan kapilleri etrafında tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiştir. Poligonal şekilli olup, merkezi konumlu bir ya da iki nükleus bulundurlar (36,37). Her tübülün etrafındaki peritübüler alanı oluşturan lamina propriada ise; kollajen lifleri içeren bir iç hat ve içsi hücrelerden zengin bir dış hat bulunur. Miyofibroblast olarak isimlendirilen bu hücreler, kasılabilme özelliklerinin yanı sıra, kollajen lif de üretebilmektedirler (34).

Seminifer tübüller, seminifer epitel ile döşeli kanallardır. Seminifer epitel ya da germinal epitelyum; spermatogenik hücreler (spermatogonyum, spermatosit-I, spermatosit-II spermatid ve sperm) ve Sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre grubu içeren çok katlı bir epiteldir (29,33). Spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri, bazal membranın üzerine oturur. Bu bazal membranın büyük çoğunluğu, ekstraselüler matriksten oluşur. Ekstraselüler matrikste; tip IV kollajen, laminin, fibrinojen, heparan sülfat, proteoglikanlar ve entaktin bulunur (38,39).

Sertoli hücreleri, puberteden sonra seminifer tübül epitelinin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Prizmatik hücreler olup, bazal membrandan seminifer tübül lümenine kadar uzanırlar (34). Spermatogenezde önemli roller üstlenirler. Hücre dışı matriks elemanlarının salgılanmasına katılır ve özelleşmiş hücre bağlantı komplekslerinin oluşumuna katkıda bulunurlar. Kan-testis bariyerinin ana unsurlarıdır, gelişmekte olan spermatogenik seriye ait hücreleri dolaşımdan gelebilecek antijenlere karşı korurlar (1,34,40). Sertoli hücrelerinin bir diğer özelliği, iyi gelişmiş hücre iskeletidir. Bu hücre iskeleti, seminifer epitelin organizasyonunu sağlar (40,42). Glukozu, germ hücreleri tarafından enerji kaynağı olarak kullanılan laktat ve piruvata dönüştürürler ve iletişim bağlantıları aracılığıyla germ hücrelerine aktarırlar (1,40,41). Spermiyasyon olayında rolleri önemlidir, fagositoz yaparlar ve proteazlar, proteaz inhibitörleri, hormonlar, enerji substratları vb gibi pek çok maddenin salgılanmasından da sorumludurlar (40-43).

SPERMATOGENEZ

Spermatogenez; erkek germ hücrelerinden, olgun spermlerin oluşmasıyla sonlanan karmaşık bir süreçtir. Spermatogenez gonadotropinlerin, steroid hormonların kontrolü altındadır. Spermatogenez; spermatogonyal faz, spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez) olmak üzere 3 evrede gerçekleşir (29);

Spermatogonyal Faz

Doğumdan önce, seminifer tübül duvarındaki spermatogonyumlar, mitoz bölünme ile sayılarını çoğaltırlar. Çoğalmaya yönelik bu bölünme, postnatal dönemde de sürer. Spermatogonyumlar, tübül duvarında belli bir sayıya ulaştıklarında mitotik aktivitelerini durdurarak, inaktif hale geçerler ve puberteye kadar inaktif halde kalırlar (31,44). Puberteden hemen önce, spermatogonyal kök hücreler farklılıklar. Bu kök hücre popülasyonundan ayrılan hücreler, tip A spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyum üretiminin başlaması, aynı zamanda spermatogenezin de başlamış olduğu anlamına gelir. Yeni oluşan hücreler, iki yoldan birini izleyebilir. Tip A spermatogonyumlar, kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da bir dizi mitotik aktivite ile farklılaşarak, Tip B spermatogonyumlara dönüşebilirler. Tip B spermatogonyumların bölünmesiyle de, spermatosit I'ler meydana gelir. Spermatosit I'ler; 46 (44+XY) kromozoma sahiptir ve başlangıçta 2d DNA içerirler. (32,44,45).

Spermatosit (Mayoz) Fazı

Spermatogenezin bu fazı; spermatosit I'lerin, spermatidleri oluşturması ile tamamlanır. Spermatosit I'ler oluştuktan kısa süre sonra ve mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler. Böylece her spermatosit; 2n kromozom ve 4d DNA içerir. Mayoz I; kromozom sayısını 2n'den, n'ye azaltır ve DNA miktarını da 4d'den, 2d'ye getirir. Böylece spermatosit II, haploid (n) kromozom sayısı ve 2d miktarda DNA ile karakterizedir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmadığı için, oluşacak her bir spermatid haploid sayıda kromozoma ve her bir kromozom tek bir kromatide (1d) sahiptir (29, 33,45).

Spermatid (Spermiyogenez) Fazı

Mayoz evresi sonucunda oluşan spermatidler, spermiyogenez adı verilen bir değişim evresi geçirerek, spermeleri meydana getirirler. Bu evrede meydana gelen değişimler kısaca;

- 1) Akrozom oluşması,
- 2) Nükleer yoğunlaşma,
- 3) Boyun, orta parça ve kuyruk gelişimi,
- 4) Sitoplazmanın geride kalan parçalarının Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmesidir.

İnsanda bir spermatogonyum, yaklaşık olarak 74 günde sperm halini almaktadır (32).

DİABETES MELLİTUS VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Diyabetin belirgin komplikasyonlarının yanı sıra, erkek üreme fonksiyonları üzerindeki etkisi her geçen gün önem kazanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle diyabetik erkeklerde, subfertilite/infertilite olgularının oldukça sık görüldüğü yönündedir (1,46). 2009 yılında yapılan bir istatistik çalışmasında diyabetik erkeklerde subfertilite prevalansının %51 olduğu belirtilmiştir (47). Aynı yıl Katar’da yapılan bir başka çalışmada da, tip 2 diyabetli 857 erkek hastada, infertilite prevalansının %35 olduğu bildirilmiştir (48).

Diyabet, birçok farklı yolla erkek üreme fonksiyonları üzerinde etkilidir. Spermatogenezin sürekliliği, tübül içi kan akımındaki glukoz seviyesine bağlıdır. Hiperglisemik veya hipoglisemik durum ile birlikte meydana gelen glukoz dalgalanmaları, spermatogenezin sürekliliğini bozmaktadır. Testislerde yer alan hücreler arasındaki metabolik işbirliği, sıkı bir hormonal kontrol altındadır. DM, hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenine etki ederek, luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH)’ların salınımındaki kontrol mekanizmalarını değiştirmektedir. Ayrıca spermatogenik seri hücreler ve özellikle spermeler, Sertoli hücrelerinin parakrin ve endokrin kontrolü altındadır. Dolayısıyla Sertoli hücrelerinde meydana gelen hormonal dalgalanmalar, spermide olumsuz etkilemektedir. DM’nin spermide, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarına sebep olarak, sperm kalitesini bozduğu ve bununla birlikte, libido azalması ve iktidarsızlık gibi önemli cinsel sorunlardan da sorumlu olduğu bilinmektedir (1,46). Eretil disfonksiyon ve ejakülasyon bozukluğu, özellikle de retrograd ejakülasyon diyabetik bireylerde sıkça tespit edilen diğer problemlerdir (1).

Hiperglisemi ile uyarılan reaktif oksijen türevleri (ROS) ve bunların aşırı üretimi sonucunda oluşan oksidatif stres, diyabet ile ilgili önemli komplikasyonlardan sorumludur. Hücre içerisinde biriken ROS'lar, hücrede apoptozis mekanizmasını hızlandırdığı gibi, sperm kalite ve fonksiyonu üzerinde de gerçek bir toksik etkiye sahiptirler (49). Hiperglisemi, enerji üretimini ve serbest radikal yönetimini değiştirerek, sperm hareketliliğinin ve konsantrasyonunun değişmesine neden olur. Yani insan spermi, oksidatif strese karşı son derece duyarlıdır (50). Ayrıca insülin direncinin patogeneğinde, ROS'ların merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (51).

Birçok çalışmada diyabetin, testis dokusunda önemli biyokimyasal ve histolojik değişikliklere yol açtığı ortaya konulmuştur (1,8,10). Özellikle hipofiz bezinden LH salınımında bozukluğa sebep olarak, Leydig hücrelerinden testosteron salınım düzeyini azalmaktadır (1,12,52,53).

Öte yandan diyabetin testis dokusunda meydana getirdiği histolojik değişimler;

- Seminifer tübüllerde atrofi ve tübül duvarını döşeyen germ epitelinde düzensizlik,
- Apoptozis,
- Bazal membran kalınlığında ve interstisyel alan hacminde artış,
- Tübül içi sperm sayısında azalma,
- Seminifer tübül duvarında veya lümeninde çok nükleuslu dev hücrelerin görülmesi,
- Vakuolizasyon,
- Vaskülarizasyonda artış (konjesyon),
- Tübül lümeninde spermatogenik seriye ait hücrelerin görülmesi şeklinde özetlenebilir (10,52).

APOPTOZİS

Apoptozis; programlı hücre ölümüdür. Hassas, kontrollü ve karmaşık sinyal yolları ile düzenlenmektedir. Apoptozis; normal gelişim sürecinde, yaşlanmada ve dokulardaki hücrelerin sürekliliğini sağlamak için gerçekleşir. Bununla birlikte; immün reaksiyonlar, hastalıklar ya da toksik ajanlara maruz kalmış hücrelerde de, savunma mekanizması olarak gerçekleşebilmektedir. Eritropoetin ve interlökin (IL)-3 gibi sitokinlerin yokluğu, hücre yaralanmaları, antikanser ilaçlar ve radyasyon gibi DNA'da hasar oluşturan ajanlar tarafından da apoptozis indüklenebilmektedir (54,55).

Apoptozisin düzenlenmesinde intrinsek (mitokondriyal) ve ekstrinsek olmak üzere iki farklı yol vardır (55,56).

İntrinsek (Mitokondriyal) Yol: Doğrudan hücre içi reseptörlere etki etmeden apoptozisi başlatan intrinsek ya da mitokondriyal sinyal yolu; reseptör olmayan uyaranları içerir ve bu uyaranlar, hücre içerisindeki hedeflerle sinyaller aracılığıyla etkileşim kurarlar. Belirli büyüme faktörleri, radyasyon, hormonlar, toksinler ve viral enfeksiyonlar gibi uyaranlar, mitokondriyal permeabilite geçiş poru (MPT)'nin açılmasına ve mitokondriyal proapoptotik proteinlerin salınımına sebep olabilmektedirler. Bu proteinler; sitokrom C, Smac/DIABLO, apoptozis indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G ve kaspaz aktifleştirici deoksiribonükleaz (CAD) proteinleridir.

Sitokrom C, apoptozis aktive edici faktör (Apaf-1)'i aktive eder ve bağlar. Bu şekilde kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşerek, apoptozis indüklenmektedir (54-56).

Ekstrinsek Yol: Apoptozisi, transmembran reseptör etkileşimleriyle başlatır. Bu sinyal yolunda, TNF reseptör gen ailesinin üyeleri bu sinyal yolağında rol almaktadır. Bunlar, benzer sitoplazmik domainler içerirler. Bu domainler; hücre yüzeyinden, hücre içine, ölüm sinyalinin aktarılmasında önemli rol oynarlar. Sinyal oluştuğunda, kaspaz aktivasyonları gerçekleşerek, hücre ölümü meydana gelir. Bazı ölüm reseptör ve ligandları; TNF- α /TNFR1, FasL/FasR, Apo2L/DR4 Apo2L/DR5 ve Apo3L/DR3'tür (54,56).

Apoptozis için sinyal alındıktan sonra, hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir (Hücrenin büzülmesi ve kondanse olması, DNA parçalanması, fosfotidilserin moleküllerinin hücrenin dış yüzeyine çıkması, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler gibi). Değişim gösteren hücreleri belirlemek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Yaygın olarak; terminal deoxynucleotidyl transferaz mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi kullanılmaktadır (57).

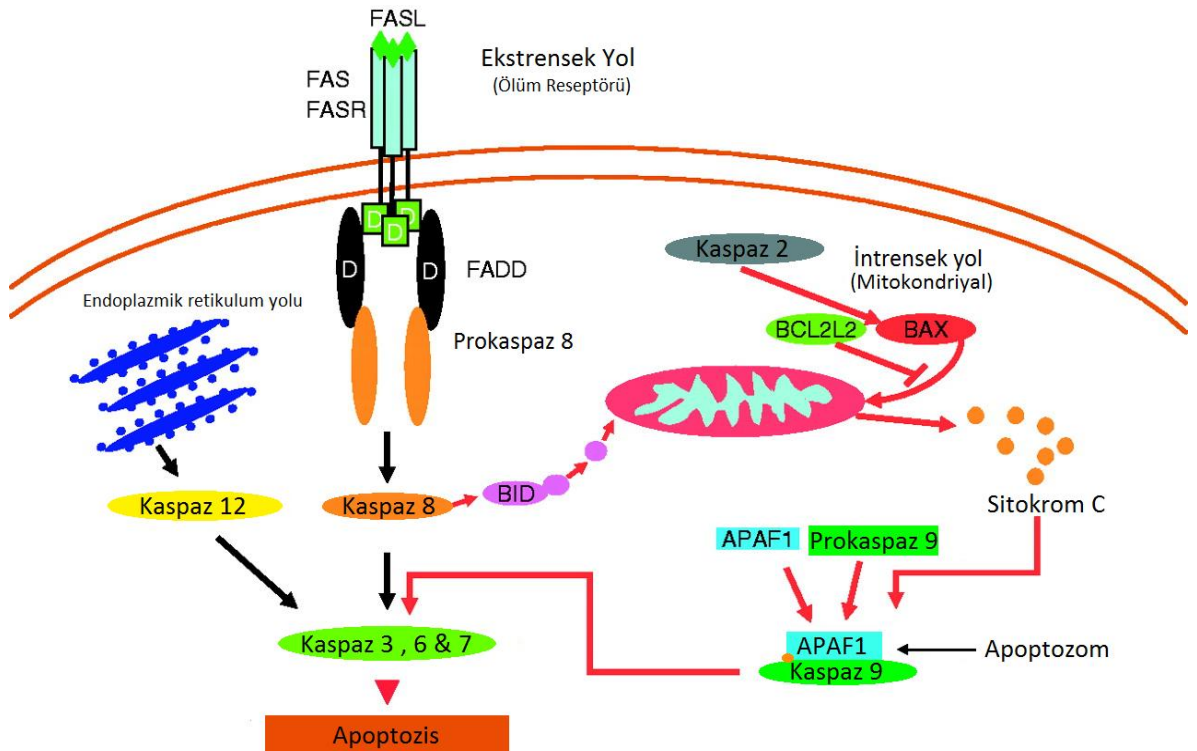
TUNEL Yöntemi: DNA kırıklarının, bulunduğu yerde tanınmasını sağlayan bir yöntemdir. Apoptozis sonucunda meydana gelen DNA parçacıklarının 3'-OH uçları, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak belirlenir. Parafin kesitlerde; TdT enzimi ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak, apoptotik hücreler tespit edilir. Bu yöntem sıklıkla "TdT-dUTP nick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılması olan "TUNEL" adıyla anılmaktadır (58).

TUNEL yönteminin yanı sıra; agoroz jel elektroforezi, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), transmisyon elektron mikroskopisi ve immünohistokimyasal olarak çeşitli apoptotik proteinlerin aktiviteleri belirlenebilmektedir (57).

Fas/FasL SİNYAL YOLAĞININ ETKİNLİĞİ

Fas; TNF ailesine ait, CD95 veya Apo-1 olarak da adlandırılan tip 1 membran proteindir ve molekül ağırlığı 45 kilodalton (kDa)'dır. Ana fonksiyonu, apoptozisi tetiklemektir. FasL ise, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesine ait, tip 2 membran proteindir. Molekül ağırlığı 40 kDa olan FasL, cDNA tarafından kodlanır (59-61).

Fas; normal dokularda epitelial ve lenfoid hücrelerde ve FasL; T-lenfositlerde, testis, beyin, göz gibi organlarda eksprese olur. Fas proteininin, kendi enzimatik aktivitesi yoktur. Bu nedenle, apoptozisin oluşmasını sağlayan sinyalin, Fas bağlayıcı proteinler ya da Fas modifikasyonu ile iletildiği düşünülmektedir.



Şekil 1. Fas/FasL sinyal yolağı (56).

Fas/FasL etkileşimi; Fas'ın, Fas ile ilişkili ölüm domaininine (FADD) bağlanmasına neden olur. Daha sonra FADD, öldürücü efektör domain (DED)'in dimerizasyonu ile prokaspaz 8 ile birleşir. Prokaspaz 8, proteolitik olarak kaspaz 8'i aktifleştirir. FADD ayrıca, kaspaz 10'u da aktifleştirir. Kaspaz 8 ve kaspaz 10 aktif olduğunda; efektör kaspazlardan olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 aktifleşir (Şekil 1). Çoğu durumda kaspaz 3, bu sinyal yolağında merkezi bir rol oynar (56,62). Effektör bir kaspaz olan kaspaz 3, yapısal proteinlerin bölünmesine sebep olarak hücrenin parçalanmasına yol açmaktadır (61,62).

Kaspaz 8 aktivasyonunun bir diğer etki mekanizması; Bcl-2 ailesine ait, pro-apoptotik bir protein olan Bcl-2 etkileşim domaini (Bid)'nin parçalanmasıyla gerçekleşir. Bid'in parçalanması, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax)'nin, hedef mitokondri membranı ile oligomerizasyonunu sağlamaktadır. Bu etkileşim, mitokondriden sitokrom C salınımına yol açmaktadır. Sitoplazmaya salınan Sitokrom C, Apaf-1'e bağlanır. Bu şekilde prokaspaz 9 aktivasyonu sağlanır. Aktif kaspaz 9 daha sonra, inaktif kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozisi indükler (54,58).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'na sunulmuş ve 2013/07.02 nolu karar ile onay alınmıştır (Ek 1). Bu onaydan sonra, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi destek için başvurulmuş ve 2013/124 No'lu proje olarak desteklenmesine karar verilmiştir. Trakya Üniversitesi Deneş Hayvanları Araştırma Birimi'nden, 3 aylık, ağırlıkları 250–320 gr arasında değişen 30 adet *Wistar albino* erkek sıçan temin edilmiştir. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip olan deneklerimizden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol grubu (n=6) ve diğeri diyabet grubu (n=6) olmak üzere 2 farklı grup oluşturulmuştur. Deneş süresince tüm deneklerimiz, stabil laboratuvar koşulları altında tutulmuş (22±1 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda), günlük içme suyu ile birlikte ham %21 protein içeren pelet yemlerle (Purina, Bursa, Türkiye) beslenmiştir.

Diyabet oluşturmak için kullandığımız streptozotosin (STZ; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya)'in iyi çözündüğü ve stabilitesini koruduğı bir solüsyon olan sitrat tamponu, steril enjeksiyonluk suyla hazırlanmış ve pH'sı 4.2'ye ayarlanmıştır. STZ, sitrat tamponunda çözüldükten hemen sonra deneklere uygulanmıştır.

Deneklerimizden;

1. Kontrol grubu; sadece pH'sı 4,2 olan 0,1M'lık sitrat tamponu verilen grup (n=6),
2. Diyabet grubu; tek doz 60 mg/kg STZ (pH' sı 4,2 olan; 0,1M' lık sitrat tamponunda çözülererek) verilen grup (n=6) olmak üzere iki grup oluşturulmuştur.

Bir aylık deney süresince, diyabetin semptom ve komplikasyonlarına bağlı olduğunu düşündüğümüz denek kayıpları meydana gelmiştir.

Deneklerin kan glukoz düzeylerine; başlangıç, STZ verilmesini takiben 2 gün sonra ve deney sonuna kadar 15 günde bir, kuyruk veninden alınan kan örneklerinde, glukometre (IME-DC, Hof, Almanya) ile bakılmıştır. STZ uygulandıktan sonra, kan glukoz değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler, "diyabetik" kabul edilmiştir. Vücut ağırlıkları ise deneyin başlangıcında ve sonunda ölçülmüştür.

Tüm deneklerin, planlanan bir aylık deney süresinin sonunda, Ketazol (Richterpharma, Viyana, Avusturya) ve Basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, sağ ve sol testis dokuları total olarak çıkarılmış, ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal çalışmalar için işlemlendirilmiştir.

İŞIK MİKROSKOBİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Işık mikroskopik rutin boyamalar ve immünohistokimyasal incelemeler için; testis doku örnekleri, %10'luk formaldehitte 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) ve sonrasında sert parafine (Merck Millipore) alınarak, parafin bloklar elde edilmiştir. Dokulardan histolojik ve morfometrik analizler için alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak hematoksilin+eozin (H+E) boyası uygulanmıştır. Entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildikten sonra, Olympus BX-51 mikroskopunda incelenerek, değişik büyütmelelerde fotoğrafları çekilmiştir.

Hazırladığımız H+E boyası uygulanmış preparatların kullanımıyla, tüm deneklerin testis doku örneklerinde seminifer tübül çaplarının ölçümü; X20'lik büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş, her preparatta 10 tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir (63).

Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) tekniğinin uygulanması ve kaspaz 8, kaspaz 3, Fas, FasL proteinlerinin immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için; 5 µm kalınlığındaki testis kesitleri, poli-L-lisin kaplı lamlara

alınmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda immünohistokimyasal işlemler uygulanmıştır.

TUNEL Prosedürü

Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanılmıştır. Bu amaçla 5 µm kalınlığında alınan kesitler, bir gece 37°C'lik etüvde bekletilmiş ve ardından oda ısısında 5 dk soğumaya bırakılmıştır. Deparafinizasyon işlemi için toluol ve dehidratasyon işlemi için alkol serilerinden geçirilen kesitler, daha sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH 7.4, İnvitrogen, California, 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 H₂O₂'e alınmış ve daha sonra kesitler dengeleme tamponu ile oda ısısında 30 dk bekletilmiş ve ardından sırasıyla tdt enzimi, durdurma/yıkama tamponu ve anti-digoxigenin peroksidaz ile muamele edildikten sonra, 3,3'-diaminobenzidine tetrahidroklorid dihidrate (DAB) kullanılarak kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin zıt boyaması yapılmıştır. Son olarak kesitler, alkol ve toluol serilerinden geçirilerek, kapatılmıştır.

İmmünohistokimyasal Prosedür

İmmünohistokimyasal incelemeler için parafine gömülen testis doku örneklerinden 5 µm'lik kesitler alınmış ve bir gece 56°C'lik etüvde bekletilmiştir. Ardından deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri uygulanan preparatlar, antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (pH 6;Invitrogen) kaynatılmıştır. Sonrasında kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için H₂O₂ (Abcam, Cambridge, ABD)'ye maruz bırakılmışlardır. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solusyonunda (Invitrogen) 10 dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikor dilüe etme solüsyonuyla (Invitrogen) hazırlanan tavşan poliklonal kaspaz 8 antikoruna (1/1000 dilüsyonda; Novus Biologicals, Kolorado, ABD), tavşan poliklonal aktif kaspaz 3 antikoruna (1/300 dilüsyonda; Merck Millipore), tavşan poliklonal Fas antikoruna (1/300 dilüsyonda; Novus Biologicals) ve tavşan poliklonal anti-FasL antikoruna (1/300 dilüsyonda; Abcam, Cambridge, İngiltere) bir saat süreyle bekletilmişlerdir. Primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen) 10 dk. oda ısısında tutulmuşlar ve son

olarak HRP-streptavidin (Invitrogen) ile 10 dk muamele edilmişlerdir. DAB (Invitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin ile zıt boyaması yapılmış ve entellanla kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analizler

Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) tekniği uygulanan her bir testis kesitinde yer alan, ortalama 100 seminifer tübülde en az 3 ve daha fazla apoptotik hücre bulunduran seminifer tübüller sayılarak “apoptotik tübül indeksi” ve seminifer tübüllerde yer alan ortalama 1000 hücredeki apoptotik hücreler sayılarak da “apoptotik hücre indeksi” hesaplanmıştır (64). Kaspaz 8, kaspaz 3, Fas, FasL immünreaktiviteyi ise; TUNEL preparatlarının değerlendirilmesinde olduğu gibi, kesitlerin hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer araştırmacı tarafından, x20 objektif kullanılarak, her preparattaki 1000 hücre içinde bulunan immünpozitif hücre sayılarına göre skorlama yapılmıştır (62).

İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı’nda SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanılmış, değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak alınmıştır. $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Mann-Whitney U testi ile kontrol ve diyabet grubundaki deneklerin kan-glukoz düzeylerinde, vücut ve testis ağırlıklarında farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Wilcoxon testi kullanılarak da; deneklerin vücut ağırlıklarının başlangıç ve deney sonu değerleri karşılaştırılmıştır. Diyabet ve kontrol grubu deneklere ait seminifer tübül çapı ölçümleri, apoptotik seminifer tübül ve apoptotik hücre indeksleri ile birlikte 1000 hücredeki kaspaz 8, kaspaz 3, Fas ve FasL immünpozitif hücre sayıları, Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ VE AĞIRLIK BULGULARI

Deneye başlamadan önce, tüm deneklerin kan glukoz düzeyleri ve vücut ağırlıkları kayıt edilmiştir. Kontrol ve diyabet gruplarının kan glukoz düzeyleri; deney başlangıcında, diyabet oluşturulduktan 2. gün sonra ve takip eden her 15 günde bir ölçülmüştür. Ayrıca vücut ağırlıkları, deneyin başlangıcında ve sonrasında kayıt edilmiştir. Testis ağırlıkları ise deneyin sonunda alınmıştır. Elde edilen veriler Tablo 1 ve Tablo 2’de verilmiştir.

Deney öncesi ölçülen kan glukoz değerlerinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmamıştır ($P=0,150$; Tablo 1).

Tablo 1. Kan glukoz düzeyi değerleri

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=6)	P
Kan şekeri ilk (mg/dl)	100.1 ± 4.7 (95-107)	107.6 ± 11.1 (90-120)	0,150
Kan şekeri 3. gün (mg/dl)	99.1 ± 4.1 (93-105)	435.8 ± 44.4 (388-488)	0,004
Kan şekeri 15. gün (mg/dl)	97.3 ± 6.6 (88-107)	449.0 ± 75.5 (324-545)	0,004
Kan şekeri 30.gün (mg/dl)	109.3 ± 9.2 (94-118)	527.3 ± 70.5 (425-599)	0,004

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Streptozotosin uygulandıktan sonra ise deney grubu kan glukoz değerleri, diyabet oluşumunu doğrulayacak şekilde (>250 mg/dl), kontrole göre anlamlı derecede yükselmiştir ($P=0,004$; Tablo 1). Ayrıca denekler sakrifiye edilmeden önce ölçülen kan glukoz değerleri de deney grubunda, kontrol grubu deneklerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P=0,004$; Tablo 1).

Kontrol grubu ile diyabet grubunda yer alacak denekler belirlenirken; özellikle vücut ağırlığı daha yüksek olanlar, diyabet grubuna alınmıştır. Bu sebeple diyabet grubu deneklerinin deney öncesi ölçülen vücut ağırlıkları, deney grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P=0,013$; Tablo 2). Sakrifikasyon öncesi iki grubun vücut ağırlıkları kıyaslandığında ise diyabet grubundaki deneklerin vücut ağırlıklarının, deney süresince kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir ($P=0,004$; Tablo 2). Kontrol ve diyabet gruplarının kendi içlerindeki kilo farkları kıyaslandıktan sonra, iki grup arasındaki fark karşılaştırılırsa, diyabet grubundaki azalma daha da belirgin olacaktır.

Bunun yanı sıra, denekler sakrifiye edildikten sonra sağ ve sol testis ağırlıkları ölçüldüğünde ise diyabet grubu deneklerinde, kontroldekilere göre anlamlı derecede düşüş belirlenmiştir (sağ testis; $P=0,010$ - sol testis; $P=0,016$; Tablo 2).

Tablo 2. Vücut ve testis ağırlığı değerleri

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=6)	P
Ağırlık ilk (gr)	243.1 ± 9.4 (233-255)	288.1 ± 30.1 (246-322)	0,013
Ağırlık son (gr)	267.1 ± 16.2 (247-288)	187.8 ± 31.9 (157-240)	0,004
Testis (sağ) (gr)	1.3 ± 0.1 (1.15-1.45)	1.0 ± 0.1 (0.78-1.22)	0,010
Testis (sol) (gr)	1.3 ± 0.1 (1.18-1.46)	1.0 ± 0.1 (0.83-1.26)	0,016

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

MORFOMETRİK BULGULAR

Deney sonrası kontrol ve diyabet grubu deneklerinin seminifer tübül çapları karşılaştırıldığında; diyabet grubu seminifer tübül çapları, kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($P=0,001$; Tablo 3).

Tablo 3. Seminifer tübül çap ölçüm değerleri

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=6)	P
Seminifer tübül çapı (µm)	269.1 ± 41.2 (212-334)	163.6 ± 31.0 (131-220)	< 0,001

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

MORFOLOJİK BULGULAR

Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular: Kontrol grubuna ait deneklerden alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri incelendiğinde; tunica albuginea ve seminifer tübülleri döşeyen epitelde organizasyon bütünlüğü izlenmiştir (Şekil 2,3).

Seminifer tübüllerde bazal membrandan lümene doğru spermatogenik seri hücrelerinin sırasıyla; spermatogonyum, spermatozoid-I, spermatozoid-II, erken ve geç spermatozoid şeklinde sıralı oldukları görülmüştür. Ayrıca seminifer tübül duvarında, kuyrukları lümene gelecek şekilde konumlanmış veya lümeninde yer alan spermatozoidler dikkat çekmektedir (Şekil 3,4).

Spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri hemen bazal membran üzerine yerleşmişlerdir. Spermatozoid-I'ler ise belirgin nükleusları, geniş sitoplazmaları ve en büyük çapa sahip spermatogenik seri hücreleri olmalarıyla kolaylıkla ayırt edilmektedir. Spermatozoidler, lümenine yakın yerleşen ve koyu boyanan nükleuslarıyla, spermatozoidler ise; uzun, iğ şeklindeki nükleusları ile lümenine yakın konumlanmış olarak izlenmektedir. Spermatozoid-II'ler çok sık izlenmemekle birlikte, spermatozoid-I'lerin hemen üzerinde konumlanmaktadır. İnterstisyel bağ dokuda Leydig hücreleri, çeşitli bağ dokusu hücreleri ve kan damarları ayırt edilmektedir. Çoğunlukla poligonal şekilli olan Leydig hücreleri ise düzgün yuvarlağa yakın, oval biçimli nükleusları ve eozinofilik boyanan sitoplazmaları ile normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 4).

Diyabet grubuna ait ışık mikroskopik bulgular: Morfometrik değerlendirme neticesinde, çaplarının kontrole göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edilen seminifer tübüllerde, şekil bozuklukları izlenmiştir. Seminifer tübül lümeninde, henüz olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülen germinal hücrelerin varlığı ve spermatogenezin kesintiye uğradığı dikkati çekmiştir (Şekil 5-10).

Seminifer tübüllerde; spermatogenik seri hücrelerinin diziliminde bozulma, hücre kaybı, organizasyon bozukluğu gözlenmiştir (Şekil 7-10). Sertoli hücreleri ile az sayıda spermatogonyumun oluşturduğu seminifer tübüllerin yanı sıra; spermatogonyum, spermatosit-I, spermatid ve sperm bulunduran tübüller de bulunmaktadır (Şekil 8). Ayrıca bazı tübüllerde dev hücreler de izlenmiştir (Şekil 6).

Sertoli hücre dejenerasyonu sebebiyle, germinal epitelde yer yer geniş vakuollerin ortaya çıktığı seminifer tübüllere de rastlanmaktadır (Şekil 9). Normal şekil, büyüklük ve yapısından farklı olan seminifer tübüllerin, etrafını çevreleyen interstisyel bağ dokuda da kalınlaşmalar dikkati çekmiştir (Şekil 5).

TUNEL Bulguları

Kontrol ve diyabet gruplarında TUNEL metoduyla, apoptotik hücreler gösterilmeye çalışılmıştır. Apoptozisin değerlendirilmesinde, “apoptotik hücre indeksi” ve “apoptotik tübül indeksi” olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında; apoptotik hücre indeksinin diyabet grubunda, kontrole göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($P<0,001$; Tablo 4).

Tablo 4’te değerleri belirtilen apoptotik tübül indeksinin de; diyabet grubu deneklerde, kontrol grubu deneklere göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir ($P<0,001$; Tablo 4).

Tablo 4. Apoptotik tübül ve hücre indeksleri

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=6)	P
Apoptotik tübül indeksi	8.2 ± 4.2 (4-17)	51.7 ± 11.5 (36-67)	<0,001
Apoptotik hücre indeksi	7.8 ± 3.1 (4-14)	33.5 ± 4.9 (27-42)	<0,001

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla kullanılan TUNEL reaksiyonuyla; kontrol grubu testis kesitlerinde, seminifer tübüllerde bulunan az sayıda hücrede pozitivite izlenmiş ve bunların özellikle spermatogonyumlar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11-13).

Ancak diyabet grubu testis kesitlerindeki seminifer tübüllerde, hücresel lokalizasyonu nükleer olan spermatogenik seriye ait çok sayıda TUNEL pozitif hücreler izlenmiştir (Şekil 14-16).

İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve diyabet grubuna ait testis dokularında uygulanan kaspaz 8, kaspaz 3, Fas ve FasL immünreaktivitelerinin değerlendirilmesi; her preparatta 1000 hücredeki immünpozitif hücreler sayılarak yapılmıştır (62). Kontrol ve diyabet grubuna ait immünreaktivite gösteren değerler, Tablo 5’te özetlenmiştir.

Tablo 5. Kaspaz 8, kaspaz 3, Fas ve FasL değerlerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=6)	P
Kaspaz 8	11.4 ± 3.3 (5-15)	71.3 ± 9.7 (57-88)	<0,001
Kaspaz 3	1.8 ± 0.8 (1-3)	11.1 ± 2.3 (8-15)	0,001
Fas	4.1 ± 3.1 (0-9)	20.2 ± 5.5 (11-27)	<0,001
FasL	14.2 ± 7.4 (6-26)	39.7 ± 9.6 (25-56)	0,001

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Kaspaz 8 immünreaktivite bulguları: Kontrol grubu testis dokusu seminifer tübüllerinde, spermatogonyumlarda ve spermatozoidlerde, hücresel lokalizasyonu sitoplazmik olan, az sayıda immünpozitif hücre izlenmiştir (Şekil 17-19).

Diyabet grubu testis dokusunda izlenen kaspaz 8 immünpozitif hücre sayısı, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (P<0,001; Tablo 5). Bu hücrelerin çoğunlukla, bozulmuş spermatogenez nedeniyle, tübül lümenine dökülmek üzere olan ya da dökülmüş spermatogonik hücreler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 20-22).

Kaspaz 3 immünreaktivite bulguları: Kontrol grubuna ait testis dokularında kaspaz 3’ün hücresel lokalizasyonunun nükleer ve sitoplazmik olması ve az sayıda immünpozitif hücrenin bulunması dikkat çekiciydi (Şekil 23,24).

Diyabetik grubun testis preparatlarındaki seminifer tübüllerde, immünlokalizasyonu nükleer ve sitoplazmik olan çok sayıda hücre izlenmiştir (Şekil 25,26). Bununla birlikte, özellikle Sertoli hücrelerindeki şiddetli immünpozitif reaktivite göze çarpmaktadır (Şekil 27).

Diyabet grubu testis preparatlarında bulunan immünpozitif hücre sayısının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece arttığı gözlenmiştir (P=0,001; Tablo 5).

Fas immünreaktivite bulguları: Fas immünreaktivitesinin plazmalemma ve sitoplazmada olduğu belirgindir. Kontrol grubunda, az sayıda spermatogonyum ve geç spermatidlerde Fas (+) immünreaktivite izlenmiştir (Şekil 28). Ayrıca interstisyel sahada bulunan Leydig hücrelerinde de immünpozitivite dikkati çekmektedir (Şekil 29).

Diyabetik grubun testis doku kesitlerinde, çok sayıda immünpozitif hücreler izlenmiştir (Şekil 30-33). İnterstisyel sahada bulunan Leydig hücrelerinde de immünpozitif reaktivite dikkat çekmektedir (Şekil 33).

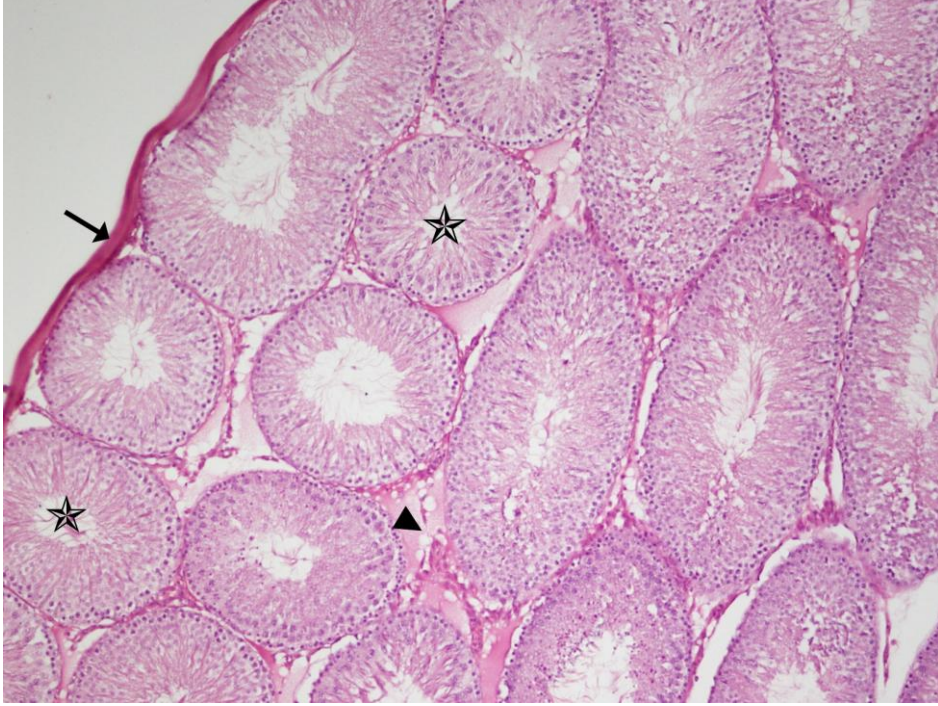
Diyabet grubu testis dokusunda bulunan immünpozitif hücre sayısının, kontrol grubuna kıyasla arttığı istatistiksel olarak belirlenmiştir (P<0,001; Tablo 5).

FasL immünreaktivite bulguları: Testis dokusunun kontrol grubuna ait preparatlarında; seminifer tübüllerde bulunan Sertoli hücrelerinde, hücrel lokalizasyonun plazmalemma ve sitoplazmada olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 34-36). Ayrıca Leydig hücrelerinde de immünpozitif reaktivite izlenmiştir (Şekil 35,36).

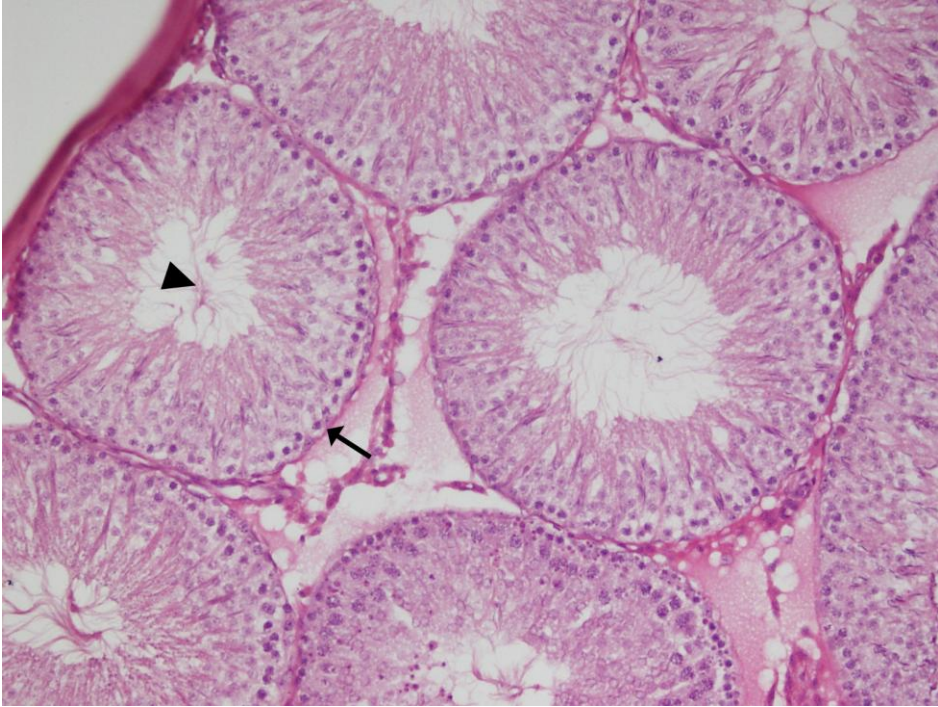
Diyabet grubunda FasL immünpozitifliğinin, sadece Sertoli ve Leydig hücrelerinde sınırlı kalmayıp, spermatogenik hücrelerde de bulunduğu ve bu hücrelerde de FasL lokalizasyonunun, plazmalemma ve sitoplazmada olduğu izlenmiştir (Şekil 37-39).

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında FasL immünpozitif hücre sayısının, diyabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek olduğu gözlemlenmiştir (P=0,001; Tablo 5).

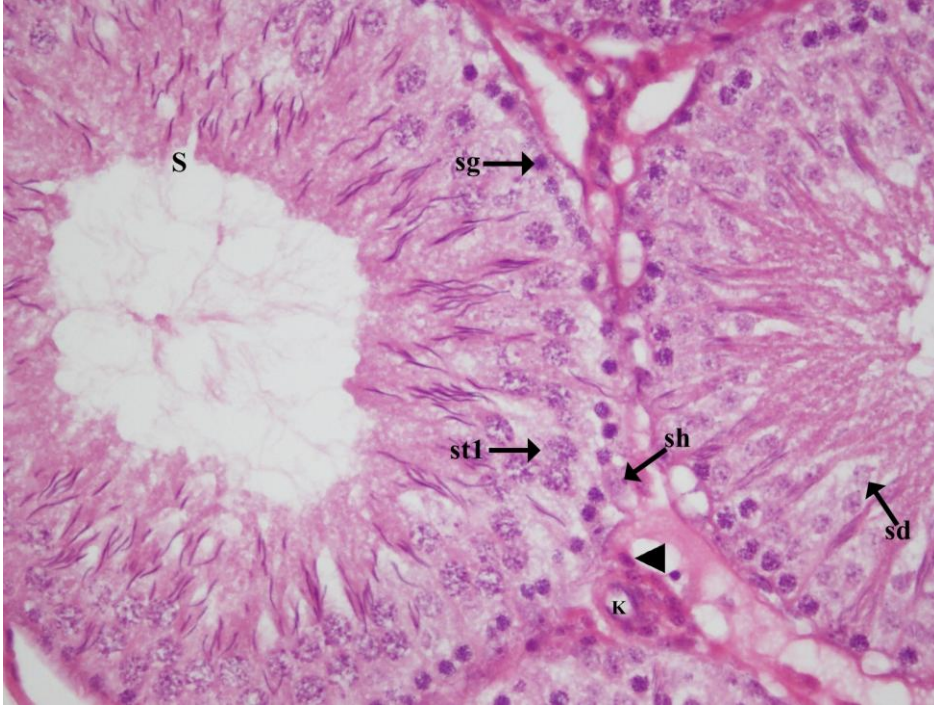
IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR



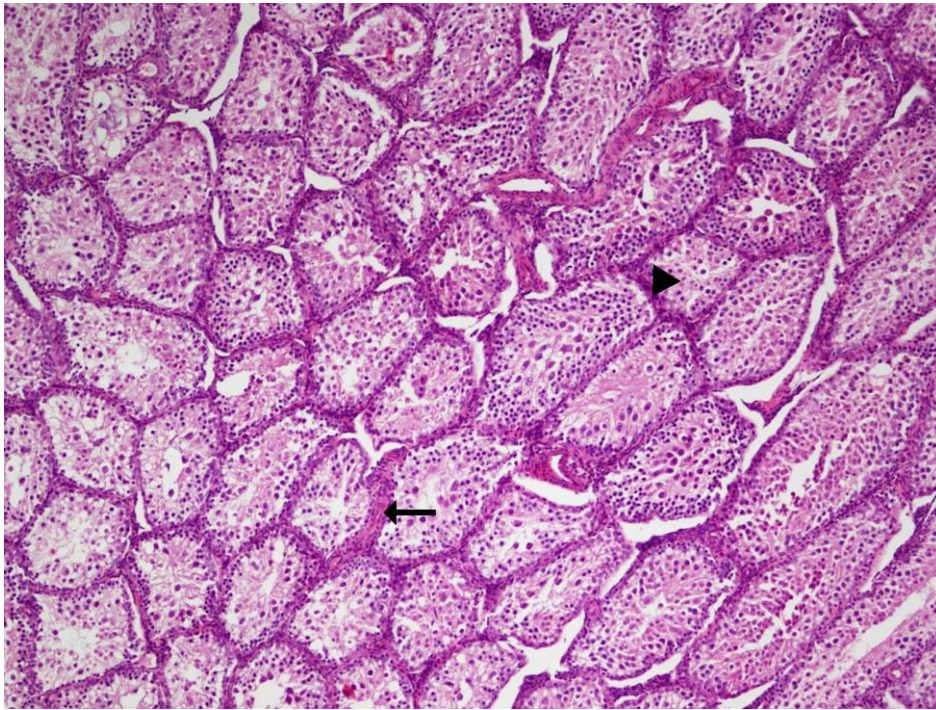
Şekil 2. Kontrol grubu testis kesitinde; Normal yapıda seminifer tübüller(*) ile interstisyel bağ doku (▶) ve tunika albuginea (→) izlenmektedir. H+E, X100.



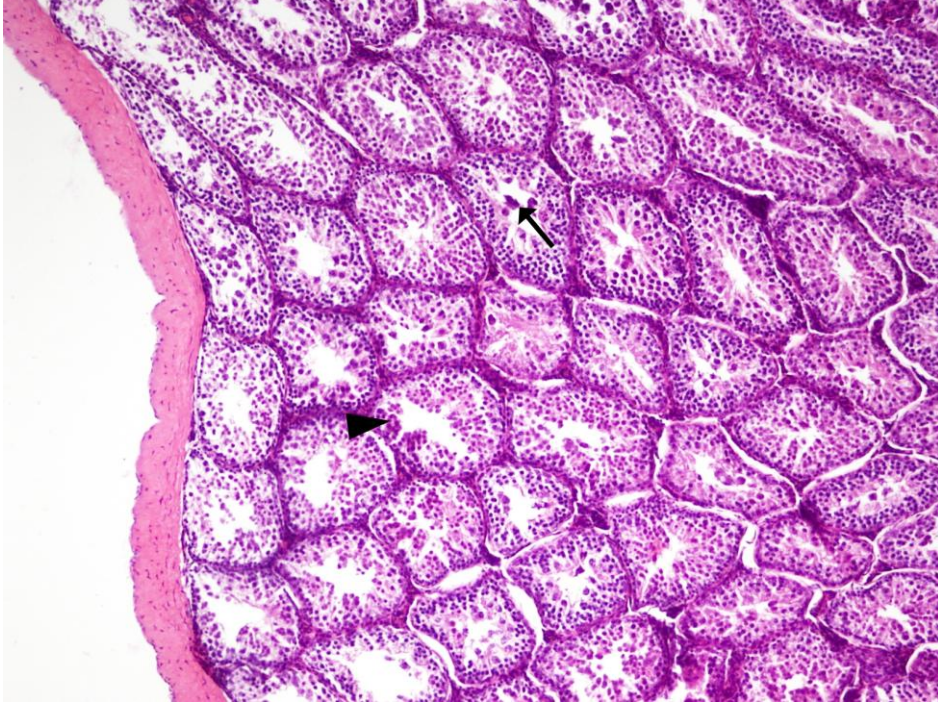
Şekil 3. Kontrol grubu seminifer tübüllerinde, bazal membran (→) ve spermatogenik seri hücrelerinin tümü ve tübül lümenlerinde olgunlaşan spermere ait kuyruklar görülmektedir (▶). H+E X200.



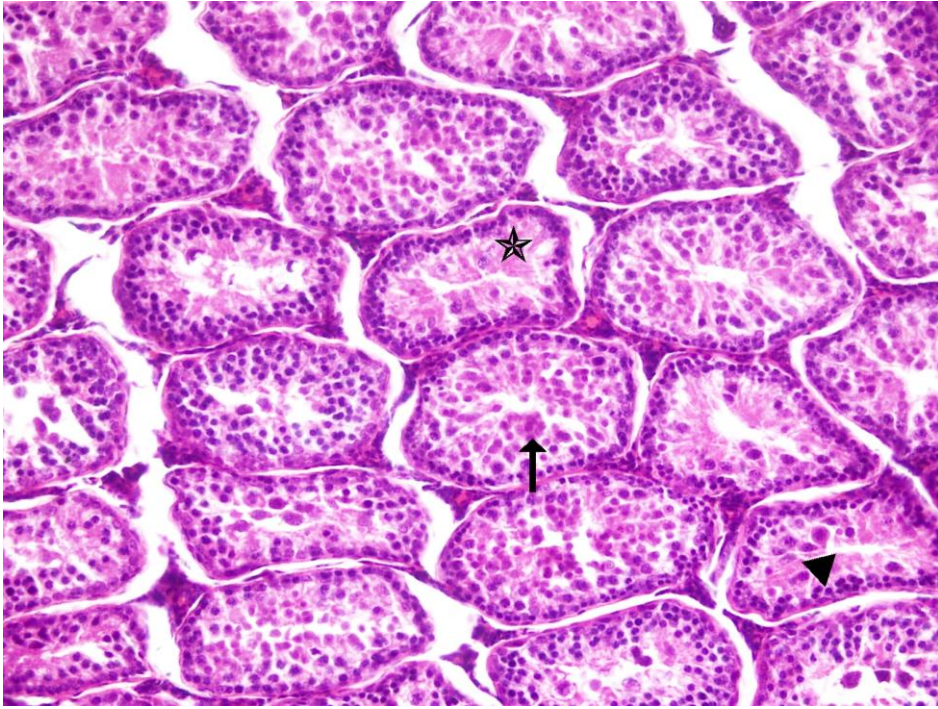
Şekil 4. Kontrol grubuna ait, seminifer tübül epitelinde spermatogonyumlar (sg), spermatosit-I'ler (st1), spermatidler (sd), sperm (S), Sertoli hücresi (sh) ve interstisyel alanda kan kapillerleri (K), etrafında yerleşmiş Leydig hücreleri (►) izlenmektedir. H+E, X400.



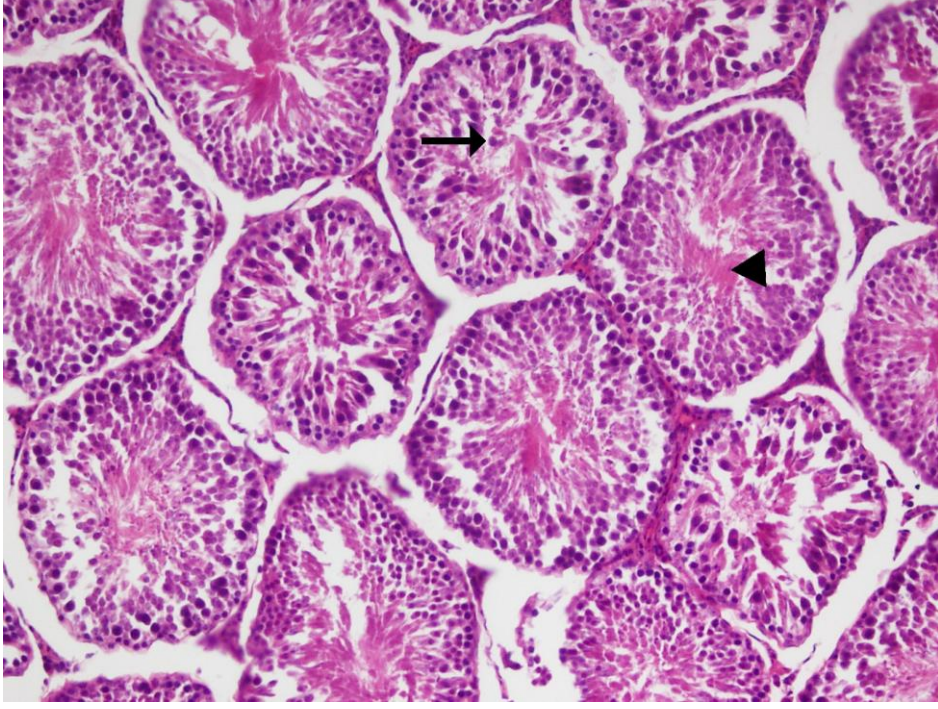
Şekil 5. Diyabet grubu testis kesitinde, seminifer tübüllerdeki değişimler (►) ve interstisyel alanda kalınlaşmalar izlenmektedir (→). H+E, X100.



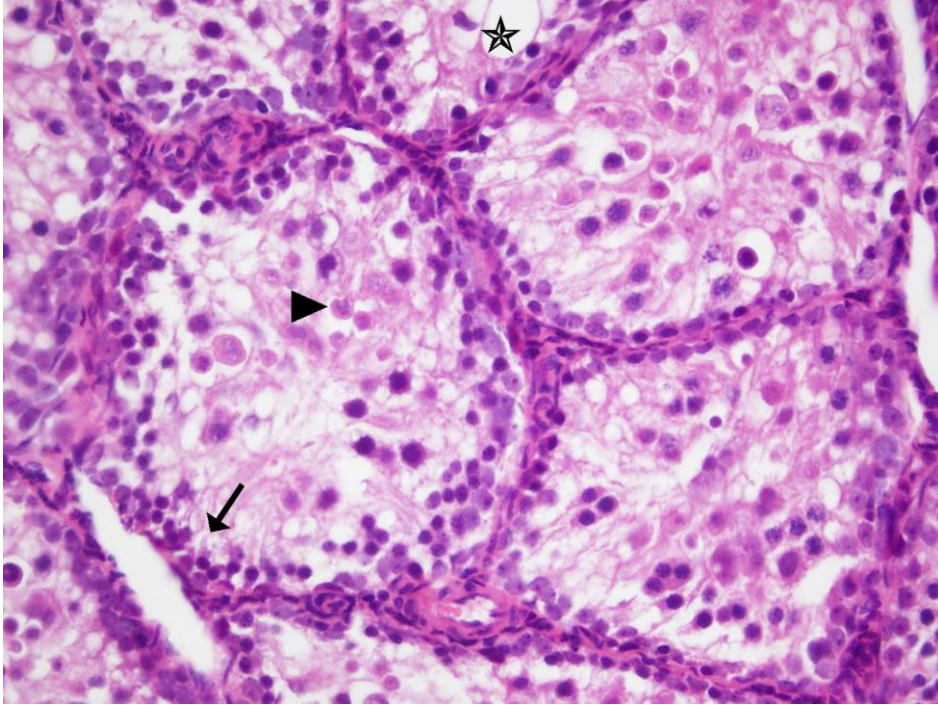
Şekil 6. Deney grubu seminifer tübüllerin, küçülen tübül çapları (►) ve tübül lümeninde dev hücreler (→) dikkat çekmektedir. H+E, X100.



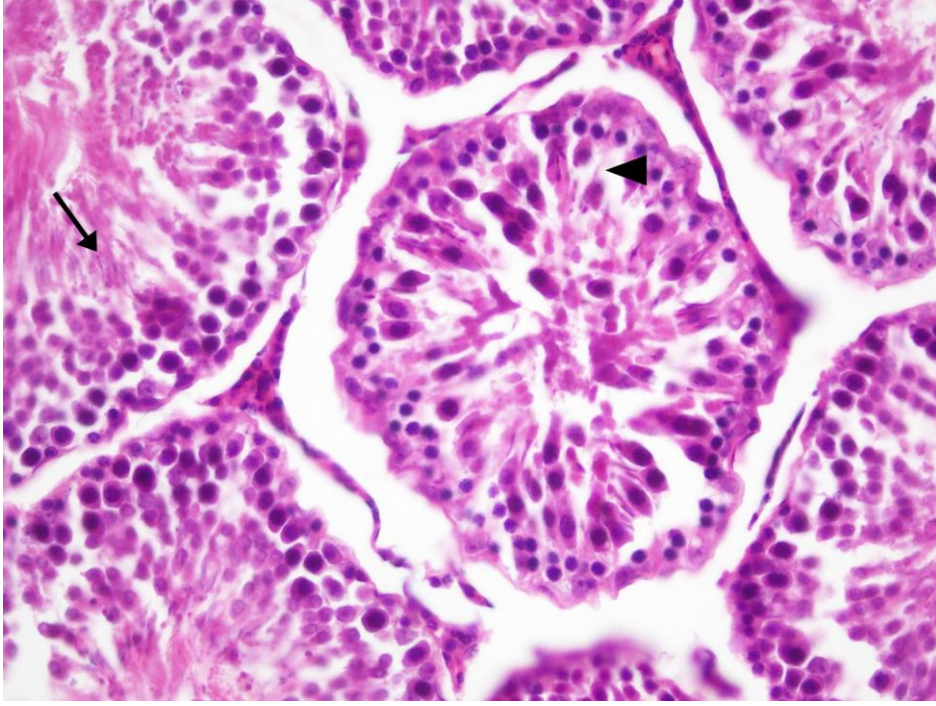
Şekil 7. Deney grubunda seminifer tübül duvarını döşeyen germ hücrelerinde düzensizlik ve hücre kaybı görülmektedir (*). Tübül lümenlerinde sperm yokluğu (►) ve dev hücreler (→) göze çarpmaktadır. H+E, X200.



Şekil 8. Diyabet grubuna ait kesitlerde, bazı seminifer tübüllerde spermatogenezin kısmen devam ettiği (►) ve aynı zamanda, seminifer tübül lümenine dökülmüş germ hücreleri (→) izlenmektedir. H+E, X200.



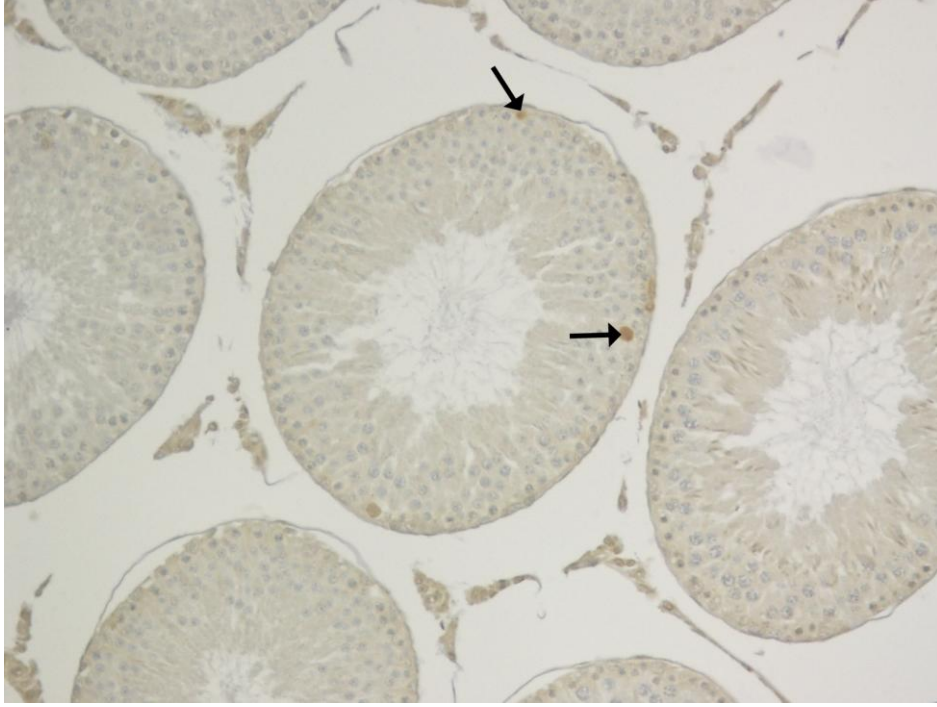
Şekil 9. Diyabetik grubun testis kesitlerinde, hücrelerde vakuolizasyonlar (*), seminifer tübül epitelinde organizasyon bozukluğu dikkat çekmektedir (►)(→).H+E, X400.



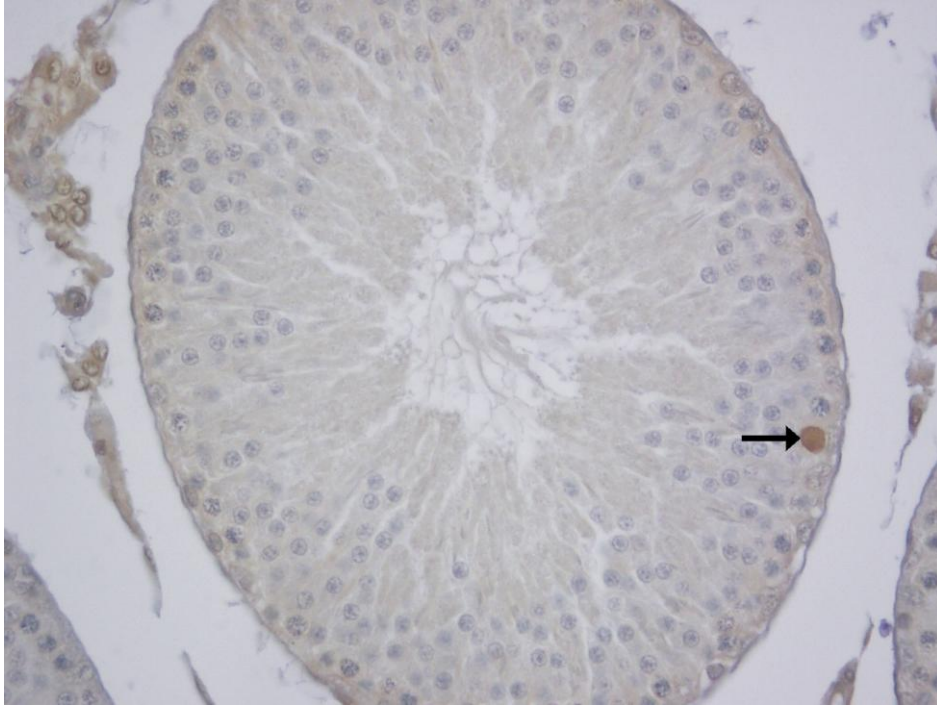
Şekil 10. Deney grubunda spermatogenik seri hücrelerinde organizasyon bozukluğu dikkat çekicidir (►). Ancak bazı tübül lümenlerinde spermlerin varlığı, spermatogenezin devam ettiğini göstermektedir (→). H+E, X400.



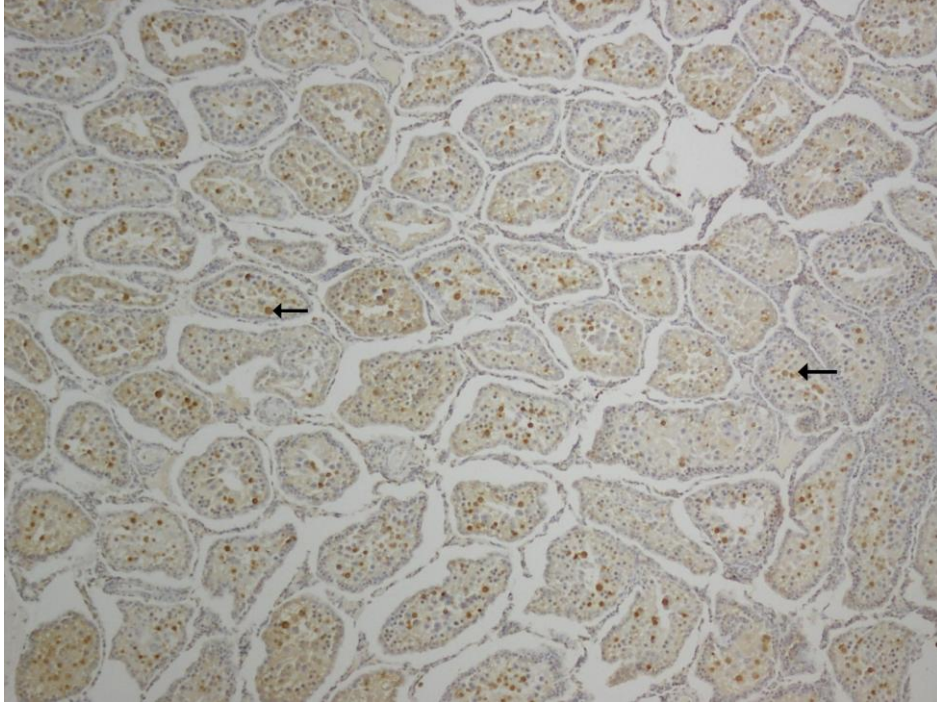
Şekil 11. Kontrol grubu seminifer tübüllerde, az sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X100. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilen zıt boyaması, X200.



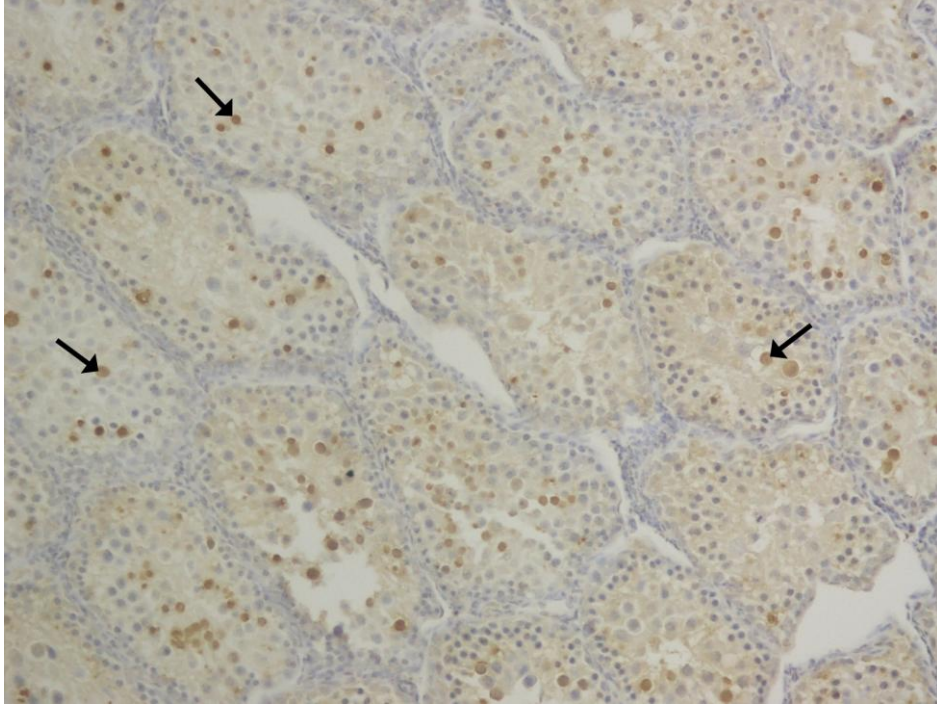
Şekil 12. Kontrol grubuna ait kesitte TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



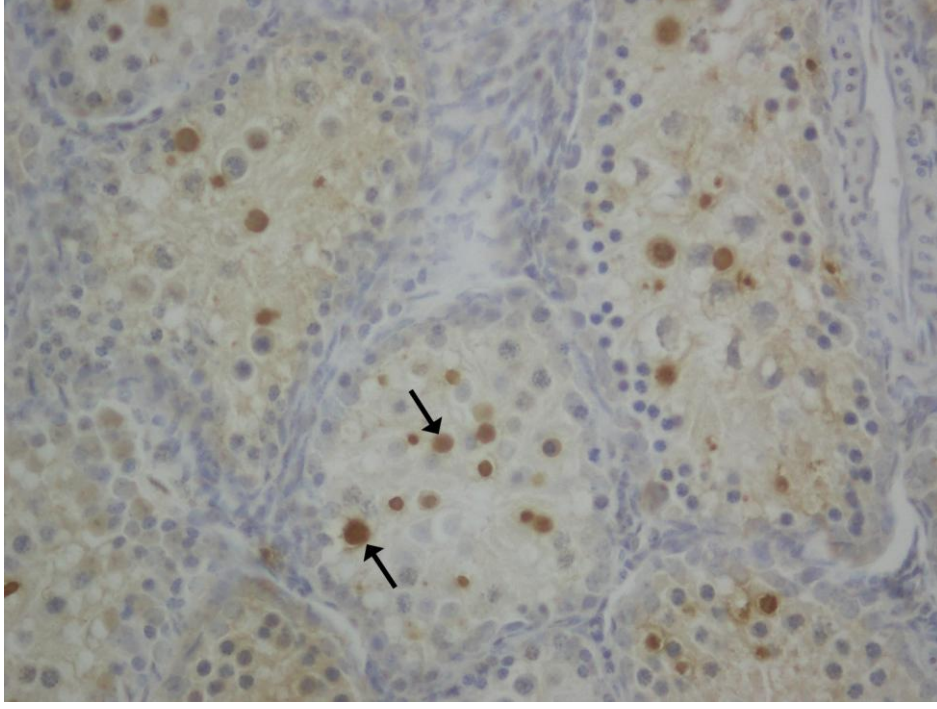
Şekil 13. Seminifer tübül epitelinde, az sayıda TUNEL (→) pozitif boyanma görülmektedir. TUNEL ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



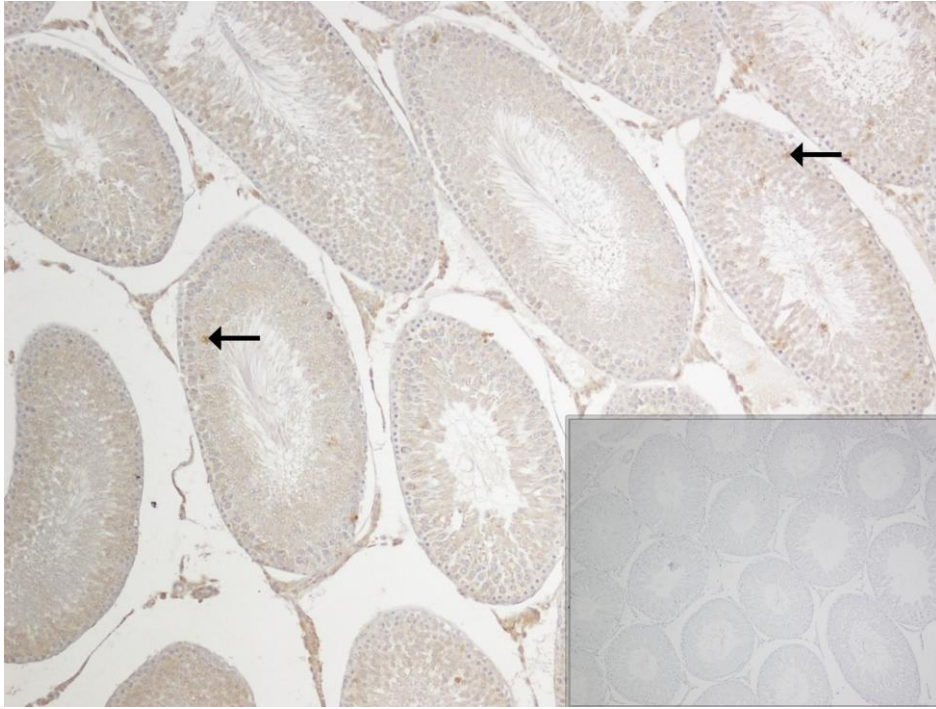
Şekil 14. Diyabet grubuna ait bu testis kesitinde, seminifer tübüllerde çok sayıda TUNEL pozitif hücreler dikkat çekmektedir (→). TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X100.



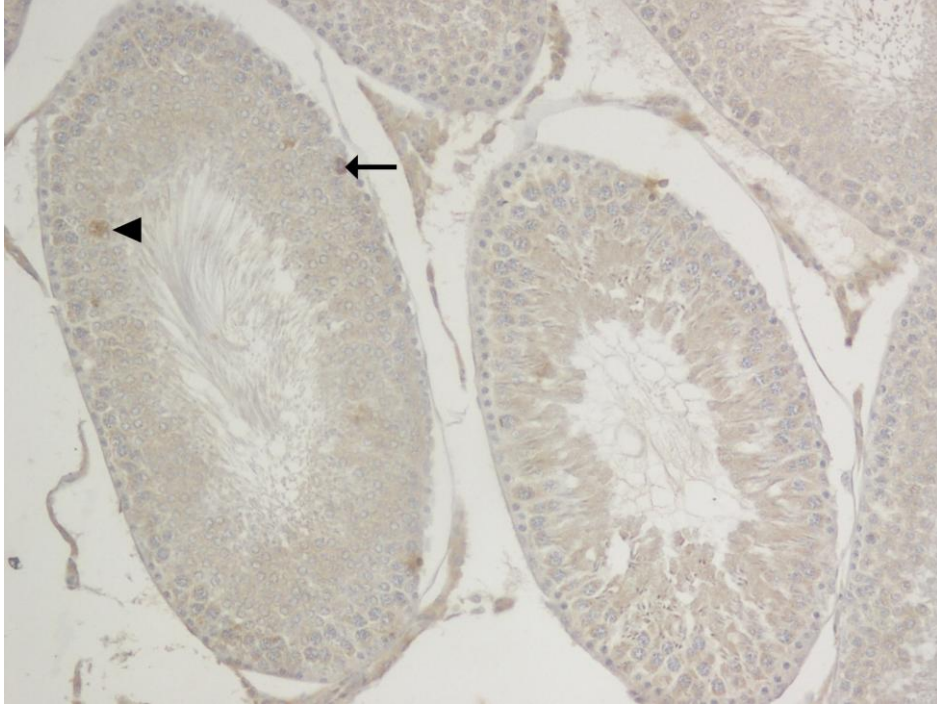
Şekil 15. Diyabet grubu seminifer tübül epitellerinde, organizasyon bozukluğu ile birlikte çok sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



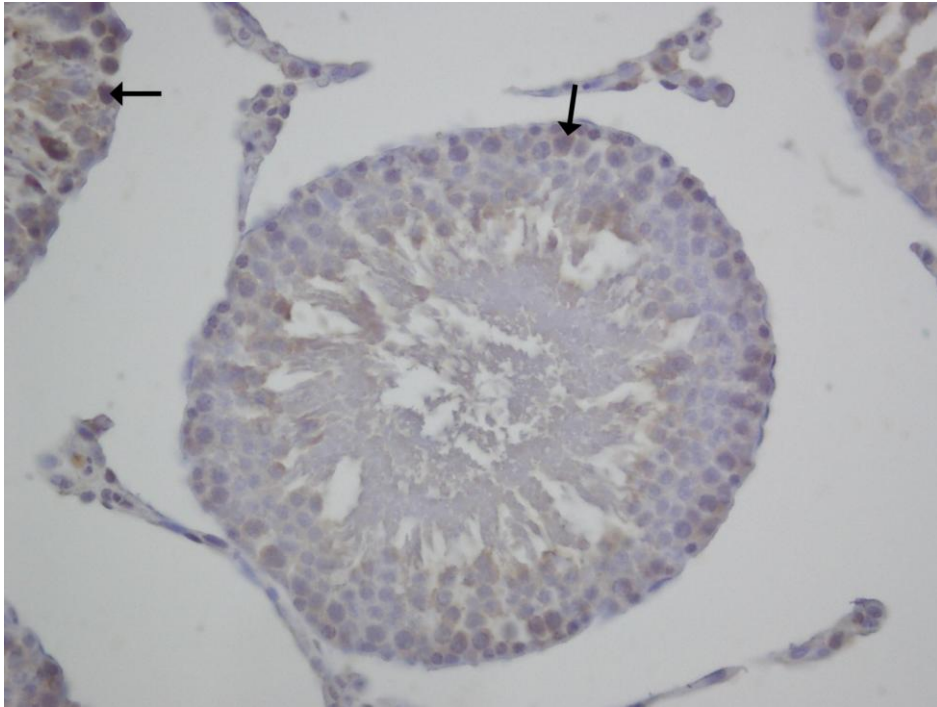
Şekil 16. Diyabetik testis dokusunda, TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



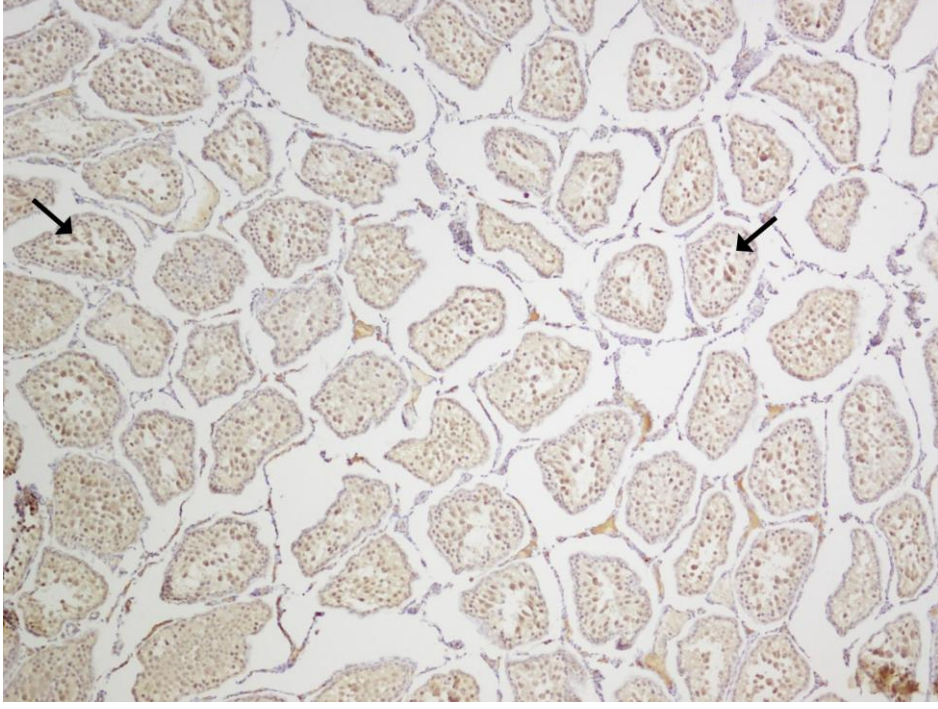
Şekil 17. Kontrol grubu seminifer tübüllerde spermatogenezin farklı aşamalarındaki hücrelerde, az sayıda immünpozitif reaktivite (→) izlenmektedir. Kaspaz 8 ve hematoksilen zıt boyaması, X100. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilen zıt boyaması, X100.



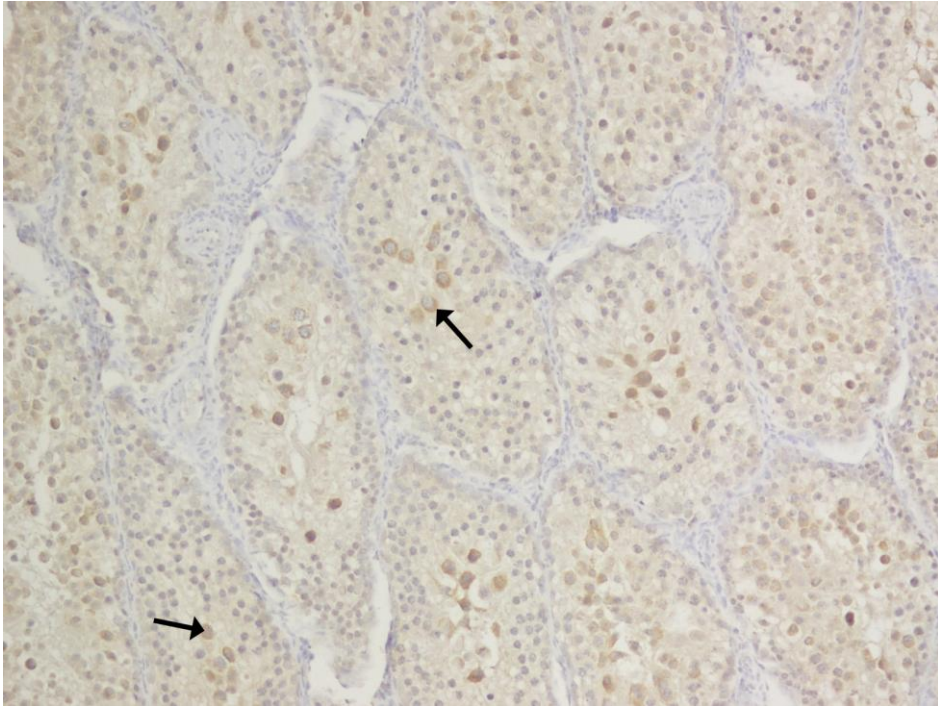
Şekil 18. Kontrol grubuna ait bu preparatta, seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait az sayıda spermatogonyum (→) ve spermatosit-1'de (▶) zayıf ve orta şiddetli immünpozitif reaktivite gösteren hücre görülmektedir. Kaspaz 8 ve hematoksilin zıt boyaması, X200.



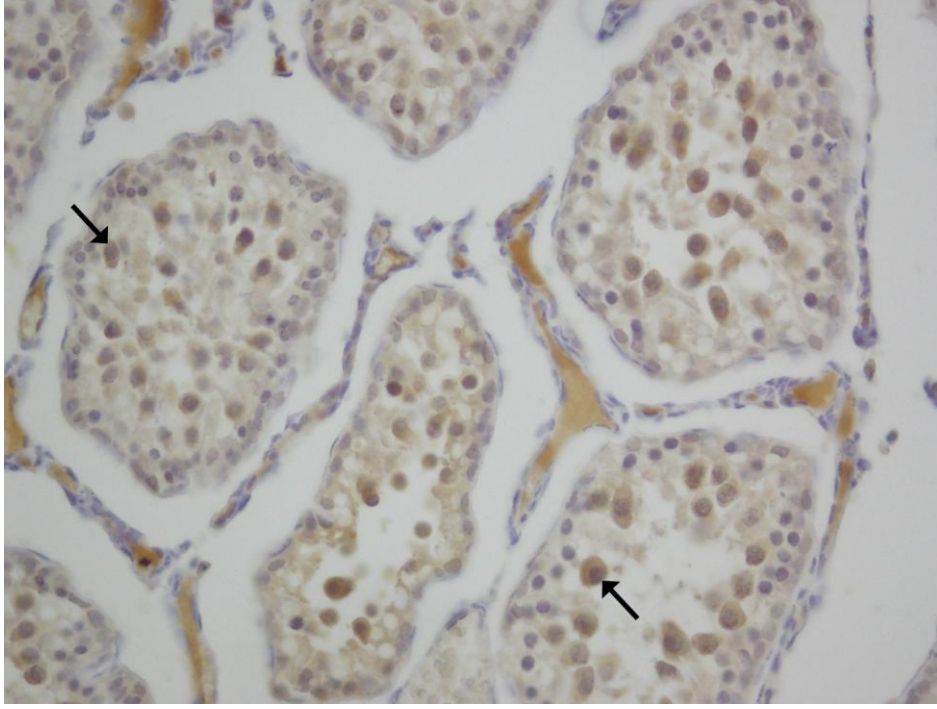
Şekil 19. Kontrol grubu testis kesitinde, kaspaz 8 immünpozitif reaktivite görülmektedir (→). Kaspaz 8 ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



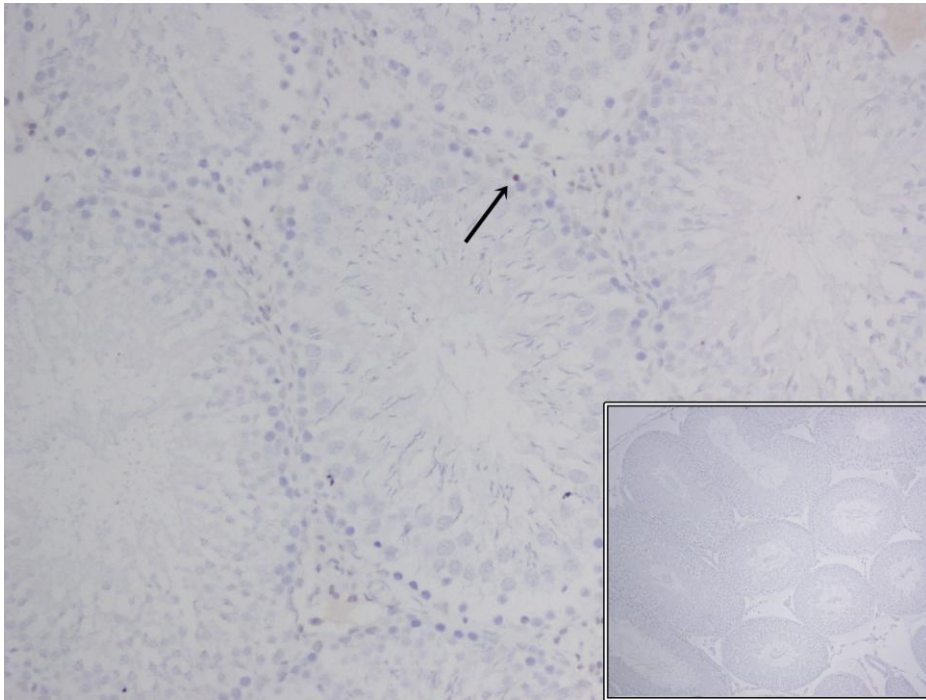
Şekil 20. Diyabetik testis kesitinde, seminifer tübüllerde çok sayıda kaspaz 8 immünpozitif hücreler dikkat çekmektedir(→). Kaspaz 8 ve hematoxilen zıt boyaması X100.



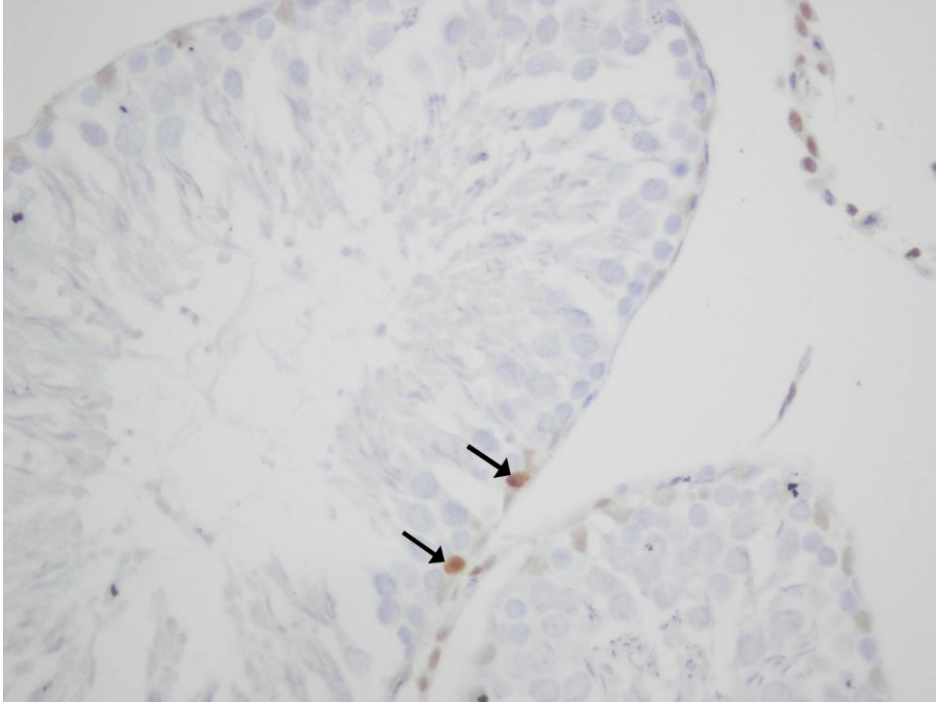
Şekil 21. Diyabet grubuna ait bu mikrografta, seminifer tübüllerde immünlokalizasyonu sitoplazmik olan çok sayıda orta ve şiddetli derecede immünpozitif hücre izlenmektedir(→). Kaspaz 8 ve hematoxilen zıt boyaması X200.



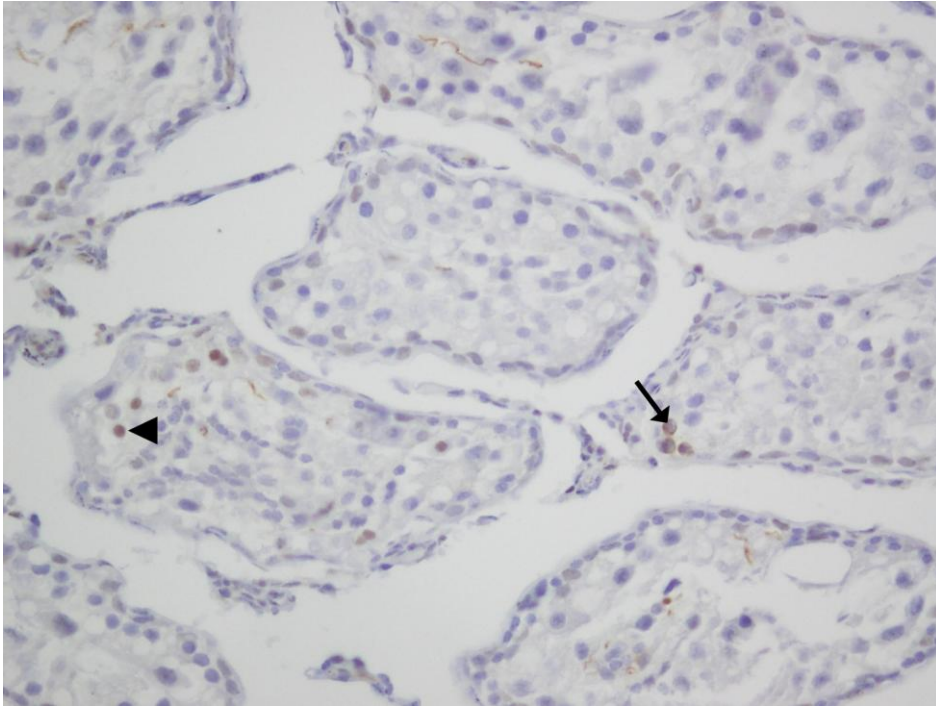
Şekil 22. Spermatogenik seriye ait hücrelerde, kaspaz 8 immünpozitif reaktivite (→) izlenmektedir. Kaspaz 8 ve hematoxilen zıt boyaması X400.



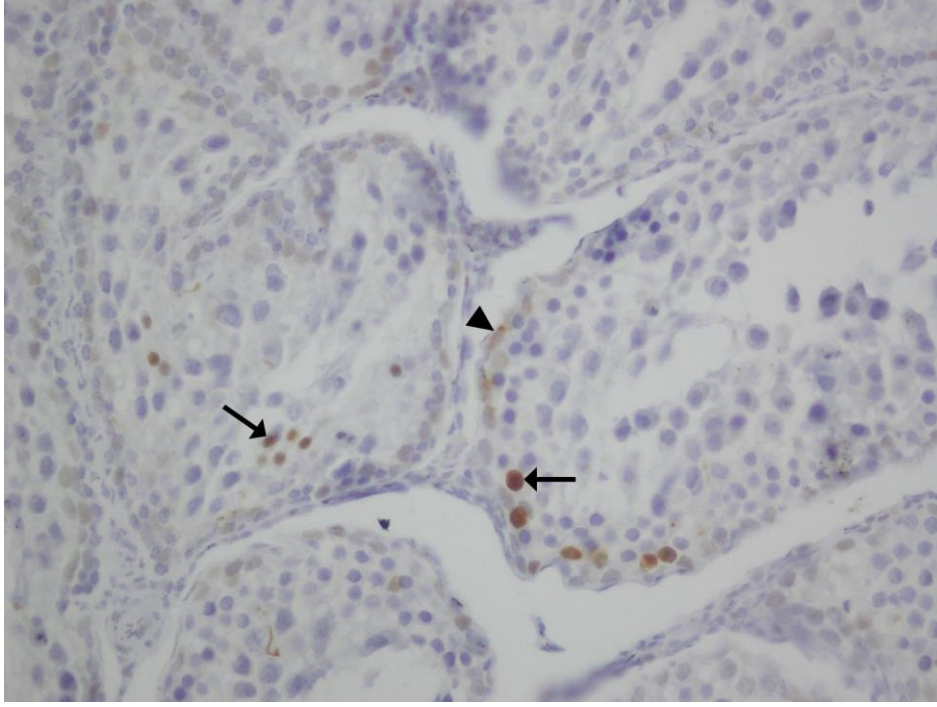
Şekil 23. Kontrol grubuna ait mikrografta, kaspaz 3'ün, seminifer tübüllerdeki az sayıda, immünlokalizasyonu nükleer olan, zayıf immünpozitif reaktivitesi görülmektedir (→). Kaspaz 3 ve hematoxilen zıt boyaması, X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoxilen zıt boyaması, X100.



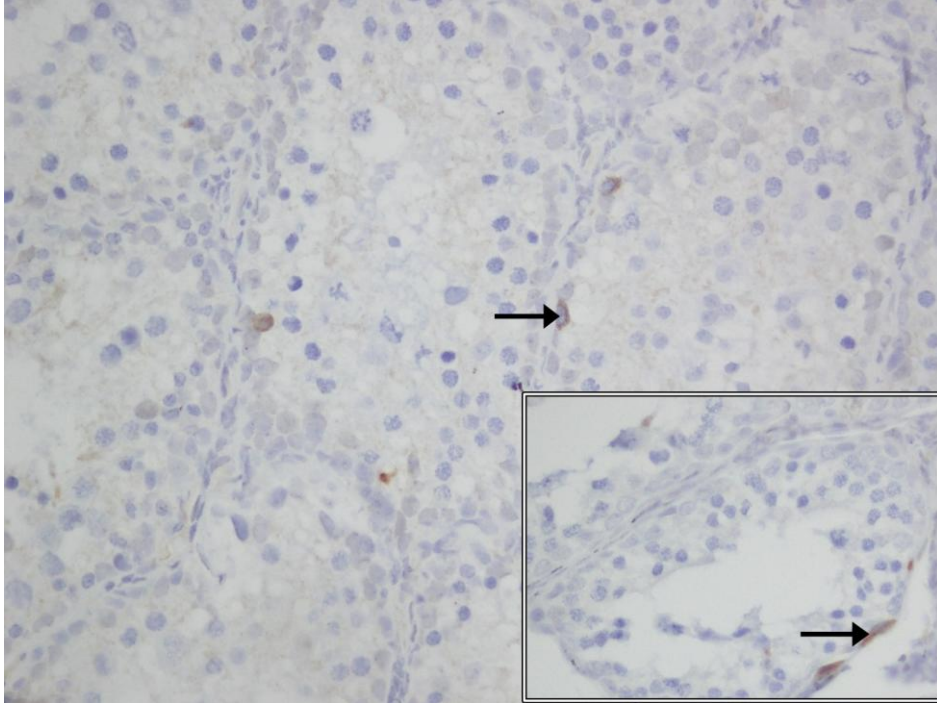
Şekil 24. Kontrol grubu seminifer tübüllerde az sayıda spermatogonyumda immünpozitif reaktivite izlenmektedir (→). Kaspaz 3 ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



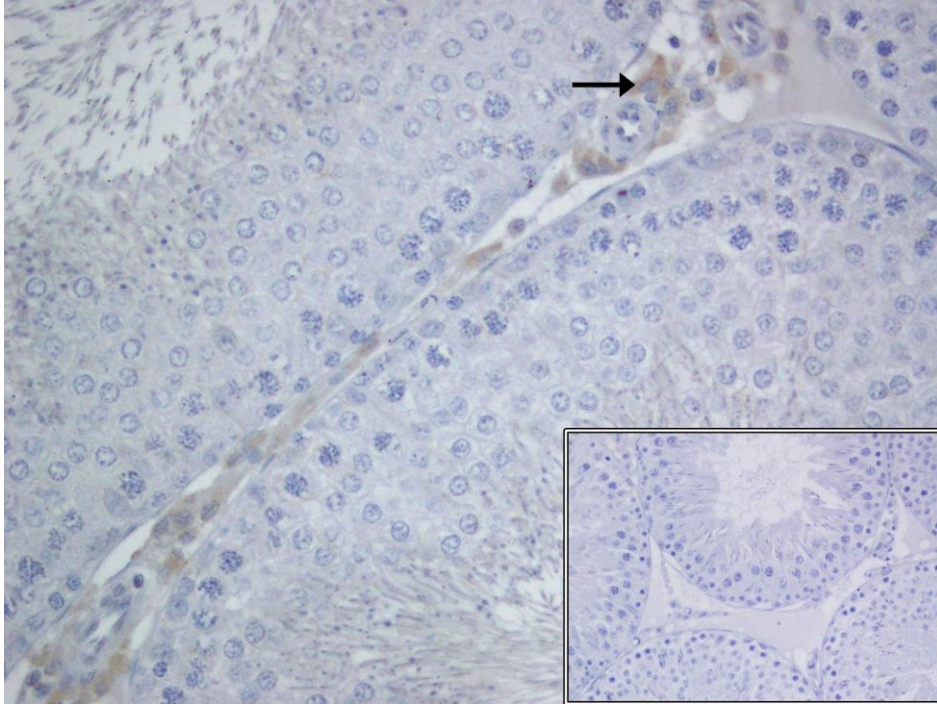
Şekil 25. Diyabet grubuna ait testis kesitinde, hüresel lokalizasyonu sitoplazmik (→) ve nükleer (▶) olan immünpozitif hücreler görülmektedir. Kaspaz 3 ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



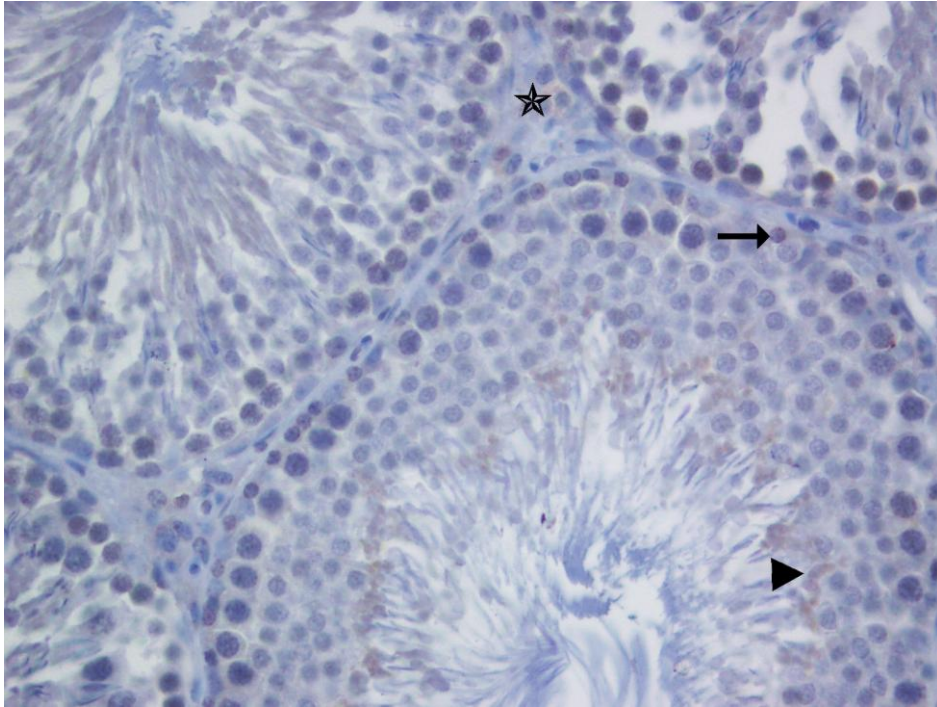
Şekil 26. Diyabet grubunda spermatogenik hücrelerde kaspaz 3 immünlokalizasyonunun nükleer ve sitoplazmik olduğu görülmektedir (→). Ayrıca bazı Sertoli hücrelerinde, lokalizasyonu sitoplazmik olan immünpozitif reaktivite izlenmektedir(►). Kaspaz 3 ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



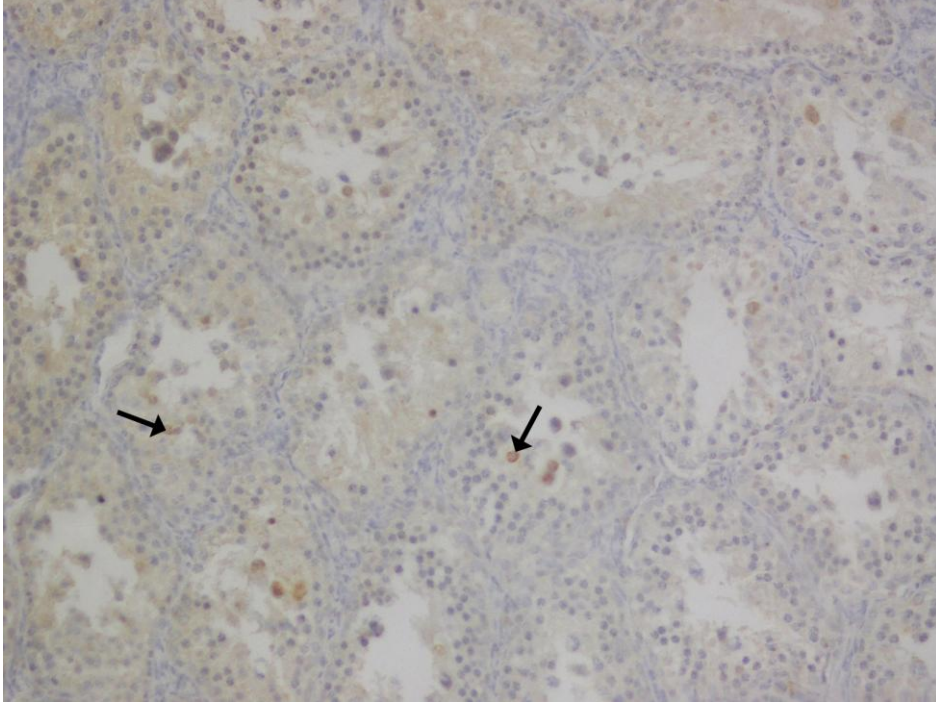
Şekil 27. Spermatogenik seriye ait hücrelerde görülen immünpozitif reaktivitenin yanı sıra, Sertoli hücrelerinde (→) görülen şiddetli immünpozitif reaktivite dikkat çekicidir. Kaspaz 3 ve hematoksilin zıt boyaması, X400. İçsel şekil; kaspaz 3 ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



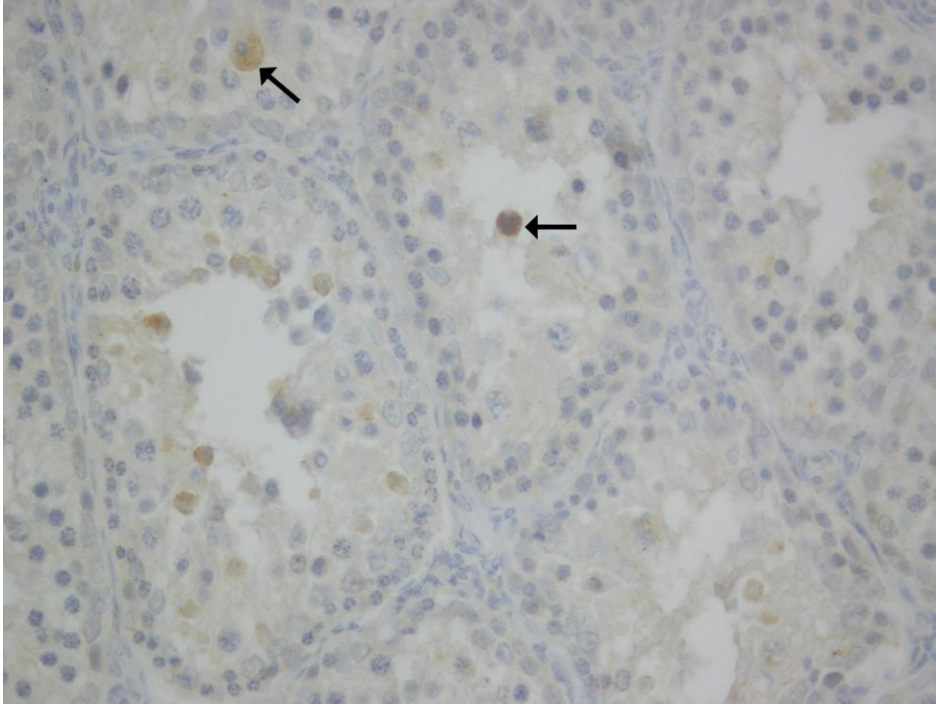
Şekil 28. Kontrol grubu, interstisyel alanda Fas immünpozitif reaktivite gösteren Leydig hücreleri görülmektedir(→). Fas ve hematoxilen zıt boyaması, X400. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoxilen zıt boyaması, X400.



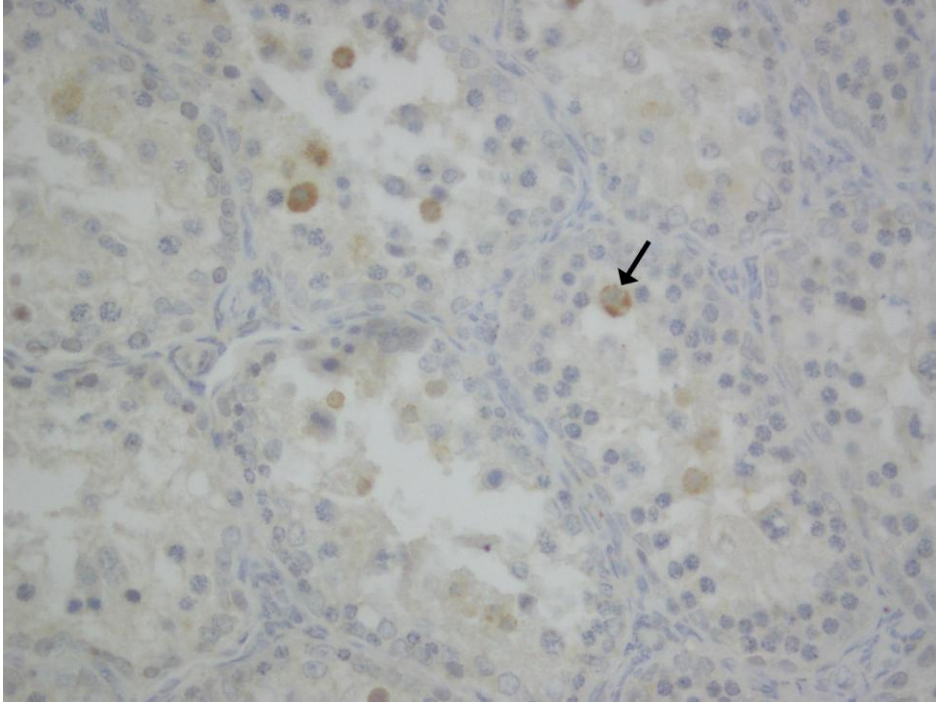
Şekil 29. Seminifer tübül epitelinde; bazı spermatogonyumlarda (→) ve geç spermatidlerde (▴), interstisyel sahada ise bazı Leydig hücrelerinde (*) zayıf immünreaktivite izlenmektedir. Fas ve hematoxilen zıt boyaması, X400.



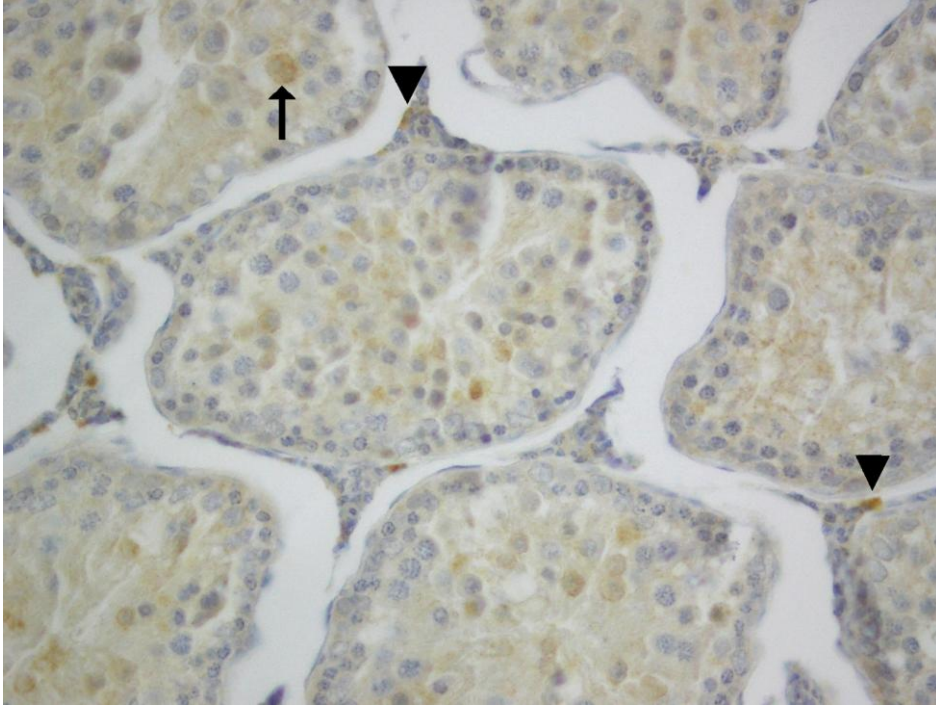
Şekil 30. Diyabet grubu, Fas immunreaktivitesi; hem plazmalemma hem de sitoplazmada izlenmektedir (→). Fas ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



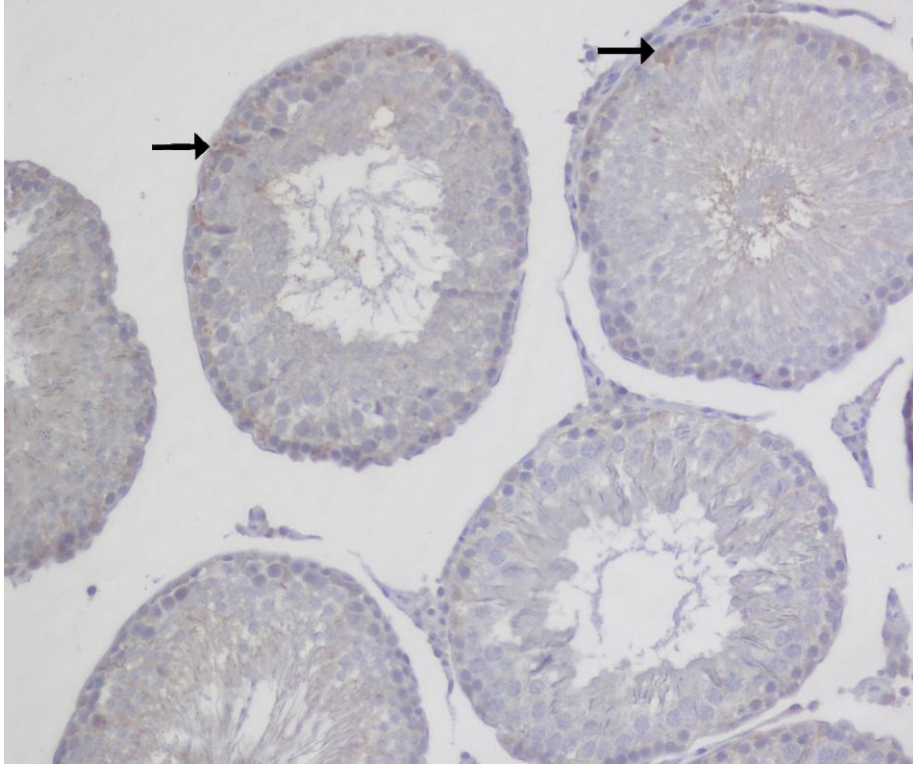
Şekil 31. Seminifer tübüllerde; çok sayıda Fas immünreaktivitesi gösteren hücre dikkat çekmektedir (→) Fas ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



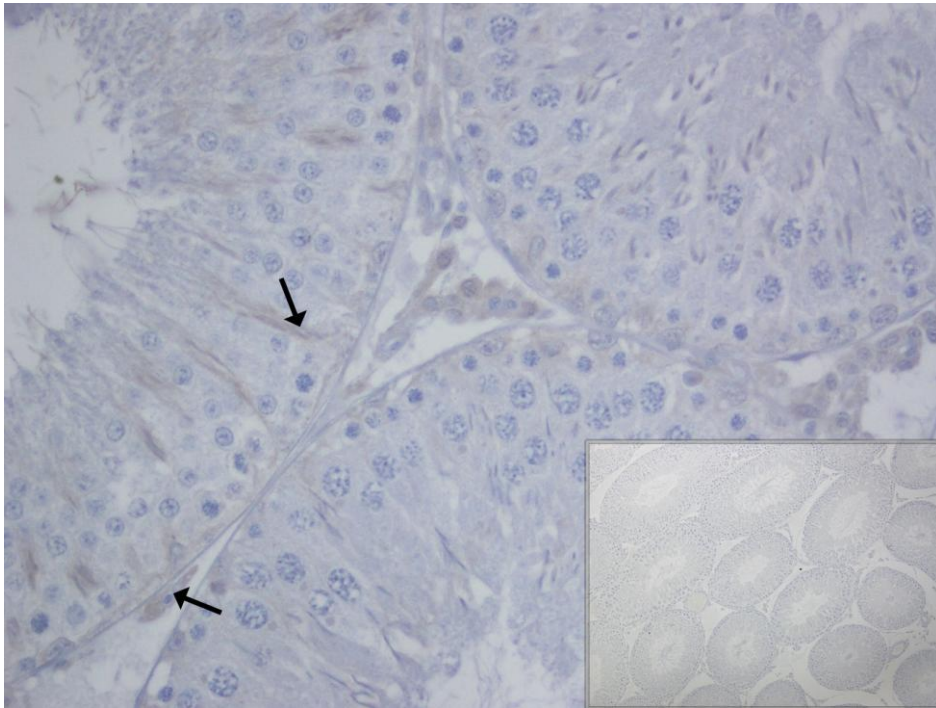
Şekil 32. Diyabet grubuna ait testis kesitinde; çok sayıda zayıf, orta ve şiddetli immün-reaktivite gösteren hücre izlenmektedir (→) Fas ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



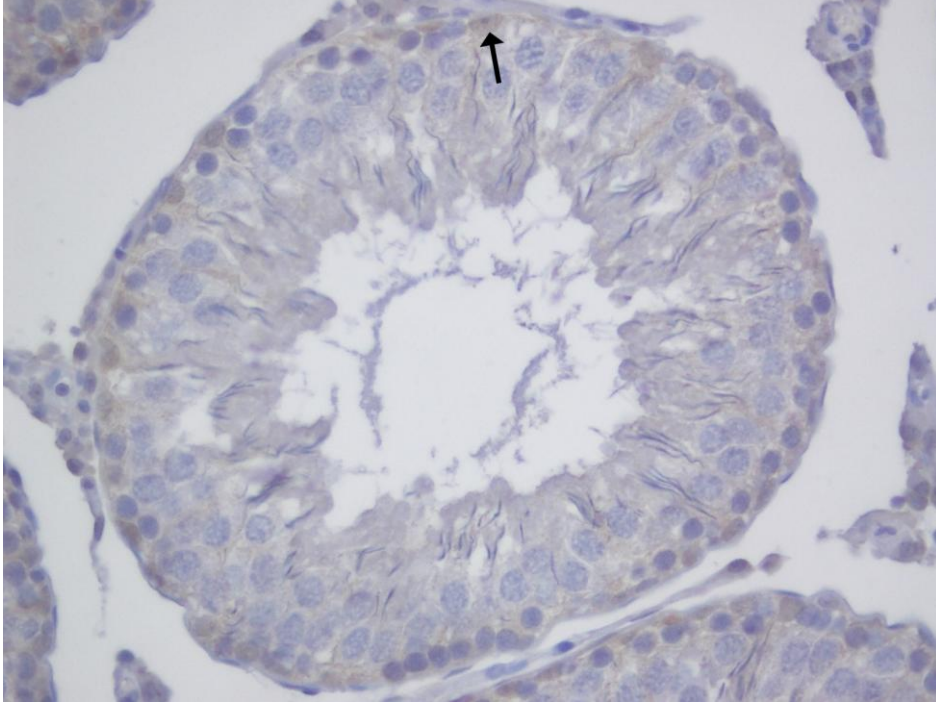
Şekil 33. Fas immünpozitif spermatogenik hücreler (→) ve ayrıca interstisyel sahada immünpozitif Leydig hücreleri de dikkati çekmektedir(►). Fas ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



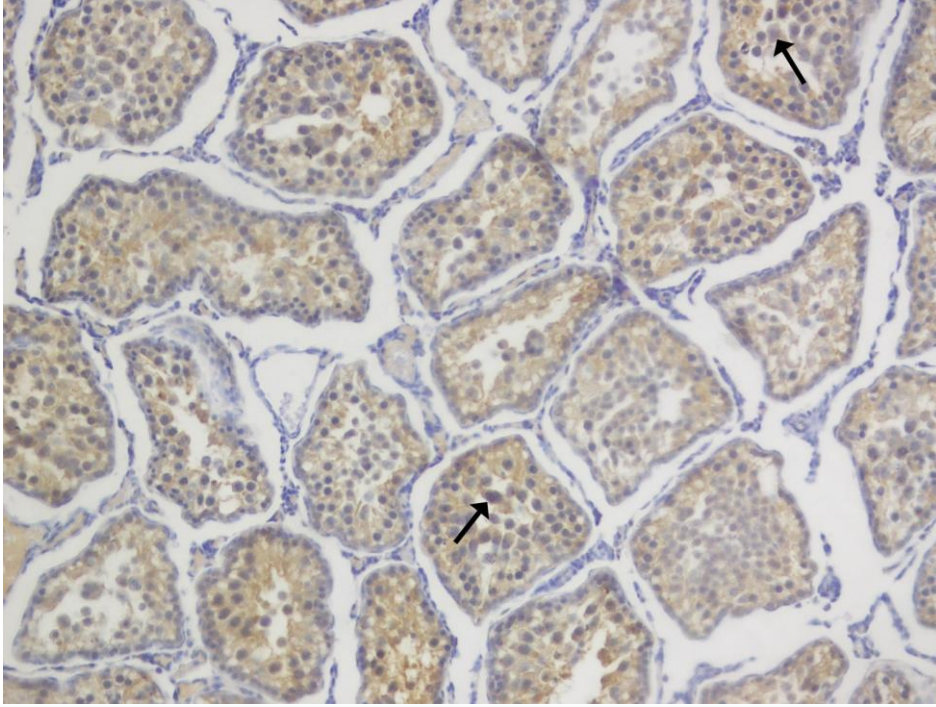
Şekil 34. Kontrol grubuna ait testis kesitinde, seminifer tübül epitelinde bulunan Sertoli hücrelerinde, FasL immünreaktivitesi görülmektedir(→). FasL ve hematoxilen zıt boyaması, X200.



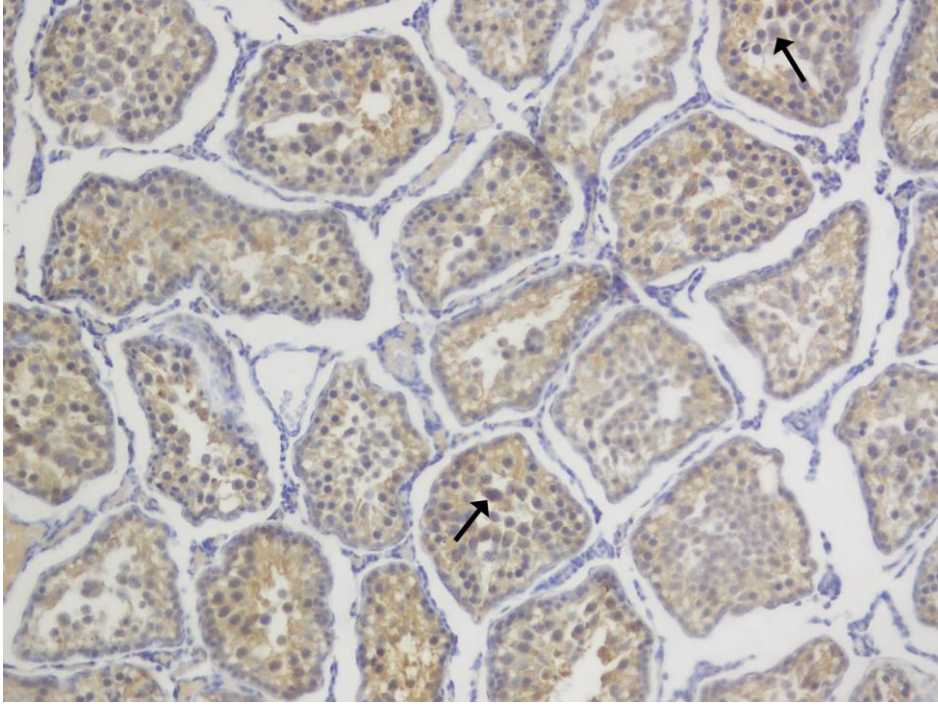
Şekil 35. Kontrol grubunda; Sertoli ve Leydig hücrelerinde, FasL immünpozitif reaktivite izlenmektedir(→). FasL ve hematoxilen zıt boyaması, X400. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoxilen zıt boyaması, X100.



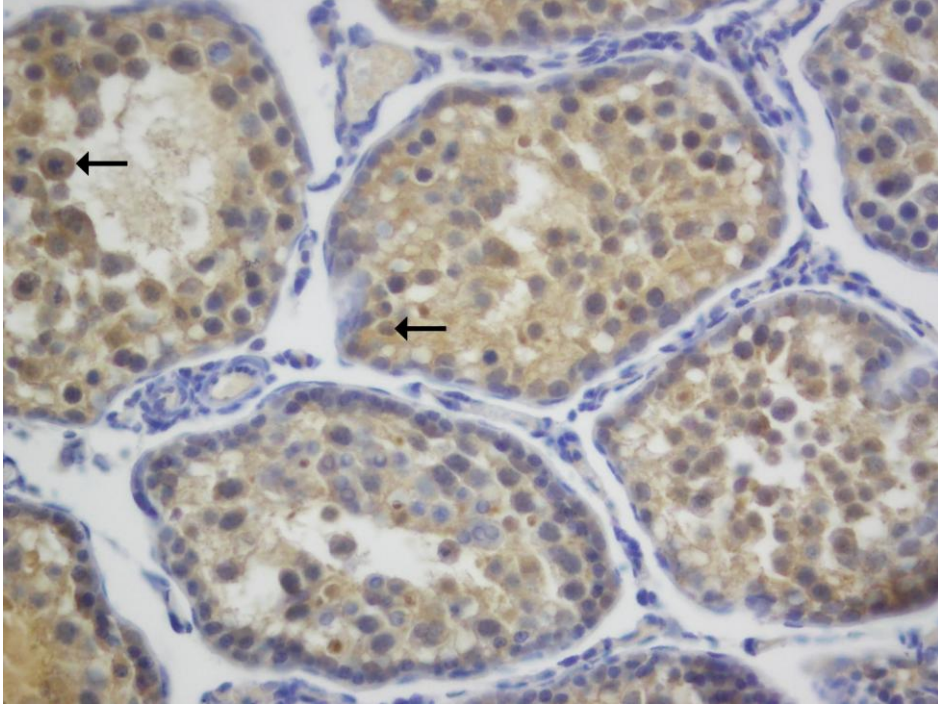
Şekil 36. Kontrol grubu, bazı Sertoli hücrelerinde immünpozitif reaktivite izlenmektedir (→). FasL ve hematoksilin zıt boyaması, X400.



Şekil 37. Diyabet grubuna ait testis dokusunda bulunan seminifer tübüllerde, FasL immün-reaksiyonunun arttığı görülmektedir(→). FasL, hematoksilin zıt boyaması, X200.



Şekil 38. Diyabet grubu, seminifer tübüllerde çok sayıda immünpozitif reaktivite gösteren hücre izlenmektedir (→). FasL, hematoksilen zıt boyaması, X200.



Şekil 39. Diyabetik gruba ait seminifer tübüllerde, FasL immunreaktivitesi hücrelerin plazmalemma ve sitoplazmasında görülmektedir (→). FasL, hematoksilen zıt boyaması, X400.

TARTIŞMA

Diyabetik erkek infertilitesi günümüzde, diyabetin komplikasyonları arasında sıkça bahsedilen ve araştırmaya açık birçok yönü olan bir konudur. Tip 1 diyabetli erkeklerde ya da ileri yaşlarda çocuk sahibi olmak isteyen tip 2 diyabetli erkeklerde, sperm kalitesi etkilendiği için, subfertilite/infertiliteye sebep olduğu ve erkek üreme fonksiyonları üzerinde de ciddi bir etkisinin olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (1,6,21,46,52,65).

2013 yılındaki bir çalışmada Roy ve ark. (66) diyabetin, sperm sayı ve hareketliliğinde azalmaya neden olduğunu, Costanzo ve ark. (67) diyabetin; hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde değişiklikler meydana getirerek, testosteron seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Klinik veriler diyabetik bireylerde; libido azalması, retrograd ejakülasyon, erektil disfonksiyon, hipogonadizm, testiküler hacimde azalma, prostat glandüler hacimde artış, seminal vezikülde kalınlaşma ve ürogenital sistemde mikrobiyal aktivitede artış olduğunu göstermiştir (47,68).

Çalışmamızda STZ uygulanan deneklerin, kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl'den fazla olanlar, diğer birçok çalışmada olduğu gibi (8,50,65,69) diyabetik olarak kabul edilmişlerdir.

Vücut ve testis ağırlıklarının; kontrol grubuna kıyasla, diyabetik grupta azaldığı yönündeki bulgularımız, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarla gerçekleştirilen birçok çalışmayla paraleldir (7,8,13,48,65,69).

Alves ve ark. (1) diyabetin neden olduğu hipergliseminin, ROS üretimini artırarak bireylerin fertilité potansiyellerini riske attığını ayrıca, ROS artışıyla birlikte süperoksit üretimini tetikleyerek; glikoz 6-fosfat dehidrogenazı inhibe ettiğini, bunun da mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. ROS üretiminde artış ve antioksidan savunmada düşüşle birlikte, sperm nükleer ve/veya mitokondriyal DNA'sının, ROS'un varlığında parçalandığını; bunun da bireylerin fertilité potansiyelleri için risk oluşturduğunu göstermektedir.

Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres; testiküler disfonksiyona sebep olmaktadır. Testis dokusunda birçok histopatolojik değişikliğin ortaya çıkmasına ek olarak, seminifer tübül çaplarında da ciddi değişimler meydana gelmektedir. Daha önceden yapılmış birçok çalışma gibi bizim çalışmamızda da, diyabet grubu seminifer tübül çaplarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (50,52,70).

Diyabetik grubun testis doku kesitlerinde izlenen histopatolojik değişiklikler; tunica albuginea ve interstisyel bağ dokuda kalınlaşma, spermatogenik seriye ait hücrelerde organizasyon bozukluğu, germ hücre kaybı, bazı seminifer tübüllerde atrofi ve hücrel vakuolizasyonlar, anormal spermatogenez ve genellikle lümene yakın konumlanmış dev hücrelerin görülmesi şeklindedir. Amaral (50) ve Bozdemir (8)'in çalışmalarında da bu bulgularla paralel bilgiler bulunmaktadır. Bunlara ek olarak Trindade ve ark. (10) seminifer tübül bazal membranlarında kalınlaşma ve tübül duvarında incelme hatta bazen tamamen atrofik tübüllerin varlığından bahsetmiştir. Köroğlu ve ark. (13) ise diyabetik testis dokusundaki bu bulgulara, bir de seminifer tübül sınıflamasıyla katkı sağlamışlardır. Hess ve arkadaşlarının yaptığı seminifer tübül sınıflamasını kullanarak (71), seminifer tübülleri normal, regresif, dejeneratif ve atrofik olarak değerlendirmişlerdir. Tek doz 65 mg/kg STZ uygulayarak bir ay sürdürdükleri çalışmalarında, regresif, dejeneratif ve atrofik tübüllerde artıştan bahsetmişlerdir.

Diyabetik testisin incelendiği çalışmalarda, testiküler disfonksiyon ile apoptozisin yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hipergliseminin neden olduğu ROS artışı ve buna bağlı olarak gelişen oksidatif stresin, apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (7,8,21,53,65). Jin ve ark. (72) diyabette ROS oluşumunu azaltmak için; ROS'un ana kaynağı olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz inhibitörü olan "aposin" ile ROS artışının engellendiğini ve buna bağlı olarak da germ hücre apoptozisinde önemli bir azalmanın meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Diyabet ile ortaya çıkan hücrel oksidatif stresin, apoptozise neden olduğu birçok çalışmanın konusu olmuştur. Çeşitli hormon ve antioksidanların kullanımıyla oksidatif stresin azaltıldığı ve buna bağlı olarak germ hücre apoptozisinde iyileşmelerin gerçekleştiğini bildiren birçok çalışma mevcuttur (6,13,52,65,66).

Hücrede apoptozisin son aşamasında DNA kırıkları meydana gelmektedir. Kırılan DNA parçacıklarının 3'-OH uçlarını belirlemede TUNEL yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (7,11,57,73). Kontrol ve diyabet gruplarında belirlediğimiz apoptotik hücre indeksi (74) ve apoptotik tübül indeksi verileri (73,75) bu konuda yapılmış daha önceki çalışmalarla örtüşmektedir (7,11). Çalışmamızda, kontrol gruplarında az sayıda olan TUNEL pozitif hücrelerin özellikle spermatogonyumlar olduğu görülmüştür. Diğer çalışmalarda olduğu gibi (7,11,65) diyabet grubu seminifer tübüllerindeki spermatogenik seriye ait TUNEL pozitif hücreler, kontrol grubuna göre önemli derece artmıştır.

İntrensek yol ile tetiklenen apoptoziste; Bcl-2 ailesine ait proteinler, mitokondriyal membran geçirgenliğinde önemli rol oynamaktadırlar. Bcl-2 protein ailesinden olan, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-x, Bclw, Bcl-X_S, BAG gibi proteinler antiapoptotik rol oynarken, Bcl-10, Bak, Bax, Bad, Bid, Bim, Blk ve Bik proteinleri ise proapoptotiktirler (54).

Sadık ve ark. (52), diyabetik sıçanların testis dokularında proapoptotik bir protein olan Bax proteininin ve anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 proteininin gen ifadesini polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Bax geninin ifadesinde önemli bir artış, Bcl-2 geninin ifadesinde ise önemli bir azalma olduğunu, Bax/Bcl-2 oranının ise anlamlı bir şekilde arttığını ileri sürmüşlerdir. Koh'un (11) yapmış olduğu çalışmada, diyabetik sıçanların testis dokularında meydana gelen apoptoziste, Bcl-2 ailesine ait proteinlerin ifadelerini western blot analizi ile araştırmışlardır. Antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-X_L proteinlerinin ifadelerinde diyabetik grupta kontrole göre önemli bir düşüş, proapoptotik Bax ve Bad proteinlerinin ifadelerinde ise diyabetik grupta kontrole göre önemli bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ekstrensek yol ise apoptozisi, transmembran reseptörler aracılığı ile indüklemektedir. Bu sinyal yolunda TNF ve TNFR ailesi üyeleri rol oynamaktadır. Ligand ve karşılığı olan öldürücü reseptörlerin birbirine bağlanması (Fas/FasL etkileşimi) Fas reseptörünün, FADD'a bağlanmasına neden olmaktadır. Bunu takiben bir dizi kaspaz aktivasyonları gerçekleşir,

prokaspaz 8 FADD'a bağlanır ve kaspaz 8 aktifleşir. Son olarak efektör kaspazlar (kaspaz 3,6,7) aktifleşerek apoptozis indüklenmiş olur (56).

Diyabet grubunda belirlediğimiz kaspaz 8 immünreaktivitesindeki artışın, apoptotik yolağın indüklendiğini işaret ettiğini düşünmekteyiz. Wang ve ark. (76) da, 2014 yılında yayınlamış oldukları çalışmada, diyabete bağlı olarak gelişen testiküler apoptoziste kaspaz 8 aktivasyonunun önemli ölçüde artmış olduğunu bildirmişlerdir. Jiang ve ark. (77), diyabetik testis dokusunda western blot yöntemi ile değerlendirdikleri kaspaz 8 aktivasyonunda, önemli bir değişikliğin saptanmadığını rapor etmişlerdir.

Kontrol grubu deneklerimizin seminifer tübüllerinde kaspaz 3 immünreaktivitesi az sayıda spermatogonyumlarda izlenmiştir. Diyabet grubunda ise kontrole göre çok sayıda spermatogenik seri hücrelerinin yanı sıra, Sertoli hücrelerinde görülen kaspaz 3 immünreaktivitesi dikkat çekmiştir. Bu grupta gözlemlediğimiz kaspaz 3 aktivasyonundaki artış, Koh (7)'un diyabetik sıçanların testis dokusunda, western blot analizi ile belirlemiş olduğu kaspaz 3 aktivasyonundaki artış ile desteklemektedir. Tek doz 65 mg/kg STZ uygulayarak diyabet oluşturan Ramzy ve ark. (78) ise testiküler apoptoziste kaspaz 3 aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Diyabetin neden olduğu testiküler apoptoziste kaspaz 3 aktivasyonunun artmış olduğunu ortaya koyan başka çalışmalar da bulunmaktadır (52,79,80).

Apoptozisin düzenlenmesinde Fas/FasL sinyal yolağının önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Deneysel olarak oluşturulan farklı modellerde, testis dokusu hasarında ortaya çıkan apoptoziste, Fas/FasL yolağının rolüne ilişkin pek çok çalışma bulunmaktadır. (81,82) Ozenci ve ark. (83) varikozel modeli oluşturarak, Fas/FasL sinyal yolağının rolüne ilişkin yaptıkları çalışmalarında, Fas ve FasL proteinlerinin testiküler apoptoziste önemli değişimler gösterdiğini bildirmişlerdir. Literatürde karşılaştığımız bir başka çalışma ise quineşrol ile oluşturdukları testis hasarında, Fas ve FasL proteinlerinin arttığını immünohistokimyasal olarak gösteren Li ve ark. (73)'na aittir.

Apoptozis görülen testis dokularında Fas ve FasL proteinleri için fikir yürütülebilen bu sonuçlardan ziyade, pek çok araştırmacının üzerinde durduğu konu; Fas ve FasL proteinlerinin testis dokusundaki hangi hücrelerde ifade edildiği ve bu hücrelerdeki lokalizasyonudur.

Lee ve ark. (82) herhangi bir ajana maruz bırakılmayan sıçanların testis dokularında yaptıkları immünohistokimyasal boyamada; Fas proteininin germ hücrelerinde özellikle de

spermatozitlerde, FasL proteininin Sertoli hücrelerinde immünreaktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) ile testis hasarı oluşturdukları ratlarda, Fas proteininin spermatozitlerde belirgin bir artış gösterdiğini, FasL proteininin ise spermatozit etrafındaki Sertoli hücre sitoplazmasında yoğunlaştığını bildirmişlerdir. Quinestrol ile testis hasarı oluşturan Li ve ark. (73) hem kontrol hemde deney gruplarında; Fas immünreaktivitesinin Leydig hücrelerinde, spermatozit-I ve spermatidlerde, FasL immünreaktivitesinin ise Sertoli ve Leydig hücrelerinde gerçekleştiğini, ancak deney gruplarında immünpozitif hücrelerin sayıca daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Özenci ve ark. (83) deneysel varikosel oluşturdukları sıçanların testis dokularında, Fas ve FasL proteinlerini değerlendirmişlerdir. Fas immünreaktivitesinin kontrol ve deney gruplarında, geç spermatidlerde ve Leydig hücrelerinde, FasL immünreaktivitesinin ise tüm gruplarda spermatogenik seri hücrelerinde, özellikle de erken ve geç spermatidlerde gözlemlendiğini, ancak deney gruplarında immünreaktivitenin daha yoğun olduğunu belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada; kontrol grubu deneklerin testis dokularında Fas immünreaktivitesinin spermatogonyum, spermatid ve Leydig hücrelerinde, diyabet grubu testis dokularında ise Leydig hücrelerinde ve spermatogenik seriye ait tüm hücrelerde olduğu görülmüştür. Sertoli hücrelerinde; kontrol ve deney grubu testis dokusunda, Fas immünreaktivitesi görülmemiştir. Kontrol grubu deneklerinde FasL immünreaktivitesi; Sertoli ve Leydig hücrelerinde izlenirken, diyabet grubunda Sertoli ve Leydig hücrelerinin yanı sıra, spermatogenik seriye ait hücrelerde de immünpozitif reaktivite tespit edilmiştir.

Literatür bilgilerine dayanarak ilk kez, diyabetik testis dokularında Fas/FasL sinyal yolağında yer alan kaspaz 8, kaspaz 3, Fas ve FasL proteinlerinin immünreaktivilerinin aynı anda gösterildiği bu çalışmada; diyabetik testis dokularında görülen apoptoziste Fas/ FasL sinyal yolağının önemli bir rolü olabileceği kanısındayız. Ancak bu yolağının rolünün, kantitatif farklı metodlarla da araştırılması ve özellikle diğer apoptotik yollarla karşılaştırılarak, öneminin vurgulanması gerektiği düşüncesindeyiz. Böylece diyabetik erkek hastalarda karşılaşılan subfertilite/infertilite olgularında, Fas/Fas ligand sinyal yolağının, inhibe edilmesine etken olabilecek çeşitli kimyasalların ve/veya antioksidanların kullanımıyla, yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesi mümkün olabilecektir.

SONUÇLAR

Diyabetik erkek infertilitesinde etkili olabileceğini düşündüğümüz apoptotik yollardan biri olan Fas/Fas ligand sinyal yolağının, diyabetik erkek infertilitesindeki rolünün aydınlatılmasına ve bu yolağın olası rolüne göre, yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesine katkı sağlamayı amaçladığımız bu çalışmada; aynı biyolojik ve fizyolojik koşullar altında tutulan *Wistar albino* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=6) ve tek doz 60mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=6) olmak üzere 2 grup oluşturulmuş ve denekler dört haftalık süre sonunda sakrifiye edilmişlerdir.

Kontrol grubu bulguları, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında;

- 1- Diyabet grubunda, kan glukoz değerleri ($527,3 \pm 70,5$ mg/dl) diyabetin oluştuğunu gösterir şekilde artarken ($P=0.004$); vücut ($P=0.004$) ve testis ağırlıkları ($P=0.01$) ile seminifer tübül çaplarının azaldığı ($P<0.001$) tespit edilmiştir.
- 2- Apoptotik tübül ve apoptotik hücre indekslerinin diyabet grubunda, kontrole göre anlamlı derecede arttığı ($P<0,001$ ve $P<0,001$),
- 3- Kaspaz 8 ve kaspaz 3 immunpozitif hücre sayılarının, diyabet grubu testis dokusunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunduğu ($P<0,001$ ve $P=0,001$),
- 4- Fas immunreaktivitesinin; her iki grupta Leydig hücreleriyle birlikte, az sayıda spermatogonyum ve geç spermatidlerde gözlemlendiği,

5- Fas ligand immunreaktivitesinin ise kontrol grubunda sadece Sertoli ve Leydig hücrelerinde izlenirken, diyabet grubunda bunlara ek olarak spermatogenik hücrelerde de bulunduğu,

6- Fas ve Fas ligand immünpozitif hücre sayılarının, kontrol grubuna kıyasla diyabet grubunda arttığı (P<0,001 ve P=0.01) belirlenmiştir.

Bu çalışmalardan elde ettiğimiz bulgular; diyabetik erkek hastalarda karşılaşılan subfertilite/infertilite olgularında, Fas/Fas ligand sinyal yolağının önemli bir rolü olabileceğini, ancak bu yolağının rolünün farklı metodlarla da araştırılması ve diğer apoptotik yollarda karşılaştırılarak, öneminin vurgulanması gerektiği sonucuna varmamızı sağlamıştır.

ÖZET

Diyabetik erkek subfertilite veya infertilitesi, son yıllarda dikkat çeken bir konudur. Subfertilite veya infertiliteye sebep olan apoptotik yollar, gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu düşünceden hareketle; Fas/Fas ligand sinyal yolağının, diyabetik erkek infertilitesindeki rolünün aydınlatılmasına ve olası rolüne göre, inhibe edilmesine etken olabilecek, yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesine, katkı sağlamayı amaçladık.

Stabil laboratuvar koşulları altında tuttuğumuz *Wistar albino* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=6) ve tek doz 60mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=6) olmak üzere iki grup oluşturduk. Diyabet grubunda; streptozotosin uygulanması sonrası ölçülen kan glukoz değerleri (>250 mg/dl) diyabetin oluştuğunu gösterir şekilde artarken (P=0,004); vücut (P=0,004) ve testis ağırlıkları (P=0,01) ile seminifer tübül çaplarının azaldığı (P<0,001) tespit edilmiştir.

TUNEL, kaspaz 8, kaspaz 3, Fas ve Fas ligand immunreaktivitelerinin değerlendirildiği bu çalışmada; apoptotik tübül ve hücre indekslerinin diyabet grubunda, kontrole göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (P<0,001 ve P<0,001).

Kaspaz 8 ve kaspaz 3 immunpozitif hücre sayısı, diyabet grubu testis dokusunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (P<0,001 ve P=0,001). Kaspaz 3 immunreaktivitesinin hem nükleer ve hem sitoplazmik olması dikkati çekmektedir.

Fas ve Fas ligand immünreaktivitelerinin ise plazmalemma ve sitoplazmada olduğu belirgindir. Kontrol grubunda, Fas immunreaktivitesi Leydig hücreleriyle birlikte, az sayıda spermatogonyum ve geç spermatidlerde de izlenmektedir. Fas ligand ise kontrol grubunda

Sertoli ve Leydig hücrelerinde immunreaktivite gösterirken, diyabet grubunda bunlara ek olarak spermatogenik hücrelerde de izlenmiştir. Diyabet grubu testis dokusunda bulunan Fas ve Fas ligand immünpozitif hücre sayısının, kontrol grubuna kıyasla arttığı belirlenmiştir ($P<0,001$ ve $P=0,001$).

Sonuç olarak, diyabetin sebep olduğu infertilite olgularında, Fas/ Fas ligand yolağının rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Testis, Kaspaz 8, Kaspaz 3, Fas/FasL

EVALUATION OF Fas/FasL SIGNALING PATHWAY IN DIABETIC RAT TESTIS

SUMMARY

Diabetic male subfertility/infertility have been topics of high interest in recent years. The apoptotic pathways which cause subfertility/infertility have increasingly been seen as important to these areas. We aim to contribute to the development of novel treatment protocols for the inhibition of the Fas and Fas ligand signaling pathway, which could have a role in diabetic male infertility.

We placed *Wistar albino* male rats, which were maintained under stable laboratory conditions, into two groups. The groups were designated as the control group (n=6) and the diabetic group (n=6) was administered a single dose 60mg/kg of streptozotocin. The body weight (P=0,004), testis weight (P=0,01) and seminiferous tubule diameter decreased (P<0,001).

An apoptotic tubules and cell indices significantly increased in the diabetic group compared with the control group (P<0.001 and P<0.001, respectively). In diabetic testis tissue, caspase8 and caspase3 immunopositive cell count increased (P<0,001 and P=0,001, respectively) compared to the control group. As both nuclear and cytoplasmic, caspase 3 immunoreactivity draws attention.

Fas and Fas ligand immunoreactivity were observed in both plasmalemma and cytoplasm. In the control group, Fas immunoreactivity was observed in Leydig cells,

spermatogonium and elongated spermatid. Fas ligand immunoreactivity in the both group was observed in Sertoli and Leydig cells. However, in the diabetic group, immunoreactivity was also observed in spermatogenic cells. The Fas and Fas ligand immunopositive cell count showed an increase in the diabetic group compared to the controls ($P<0,001$ and $P=0,001$, respectively).

We conclude that the Fas/Fas ligand signaling pathway might have a role in infertility caused by diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, Testes, Caspase 8, Caspase 3, Fas/FasL

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Scalone L, Cesana G, Furneri G, Ciampichini R, Beck-Peccoz P, Chiodini V et al. Burden of diabetes mellitus estimated with a longitudinal population-based study using administrative databases. *Plos One* 2014;9(12):e113741.
3. 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.
4. Du YF, Ou HY, Beverly EA, Chiu CJ. Achieving glycemic control in elderly patients with type 2 diabetes: a critical comparison of current options. *Clin Interv Aging* 2014;18(9):1963-80.
5. International Diabetes Federation. *Diabetes atlas*, 6th edition, 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas> (16.09.2014 tarihinde erişildi).
6. 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.
7. 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.
8. Bozdemir-Dönmez Y, Kizilay G, Topçu-Tarladaçalışır Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testes. *Acta Cir Bras* 2014; 29(10):644-50.

9. Abbasi Z, Tabatabaei SR, Mazaheri Y, Barati F, Morovvati H. Effects of sesame oil on the reproductive parameters of diabetes mellitus-induced male rats. *World J Mens Health* 2013;31(2):141-9.
10. 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.
11. 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.
12. Zhao Y, Zhao H, Zhai X, Dai J, Jiang X, Wang G, et al. Effects of Zn deficiency, antioxidants, and low-dose radiation on diabetic oxidative damage and cell death in the testis. *Toxicol Mech Methods* 2013;23(1):42-7.
13. 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.
14. Reddy P, Duggar B, Butterworth J. Blood glucose management in the patient undergoing cardiac surgery: A review. *World J Cardiol* 2014;6(11):1209-17.
15. Taş S, Sarandöl E, Dirican M. Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Sci World J*. Baskıda 2014. doi: 10.1155/2014/351598.
16. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. İliçin G, Ünal S (Editörler). İç hastalıkları. 2.Baskı. Ankara. Güneş Kitapevi 2003;2279-91.
17. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:11-61.
18. Türkiye diyabeti önleme ve kontrol programı eylem planı, <http://www.saglik.gov.tr/.../turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-programi>. (20.10.2014 tarihinde erişildi).
19. Islam ST, Srinivasan S, Craig ME. Environmental determinants of type 1 diabetes: A role for overweight and insulin resistance. *J Paediatr Child Health* 2014;50(11):874-9.
20. Mallidis C, Gren 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.

21. 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.
22. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes. Diabetes Care 2003;26(1):5-20.
23. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. J Clin Invest 2005;115(3):485-91.
24. İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri. Türk Klinik Biyokimya Derg 2004;2(3):127-36.
25. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. Genel Tıp Derg 2007;17(4):231-36.
26. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res 2001;50:536-46.
27. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. Turk Jem 2012;16:34-40.
28. Yıldırım M. Topografik anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2014:330-6.
29. Ross MH, Pawlina W. Erkek üreme sistemi (çeviri: N. Demir). Baykal B (Editör). İlişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji Ankara: Palme Yayınları;2014.s.787-8..
30. Moore KL, Dalley AF (Çeviri: K. Şahinoğlu). Kliniğe yönelik anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007:198-203.
31. Moore KL, Persaud TVN (Çeviri: S. Müftüoğlu, P. Atilla, F. Kaymaz) Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri. 7. Baskı. İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri; 2009;176-8.
32. Sadler TW (Çeviri: AC Başaklar). Langman medikal embriyoloji. Ankara: Palme Yayıncılık; 2011:27-31.
33. Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji. Malatya; Pelikan Yayıncılık, 2004:305-15.
34. Ovalle WK, Nahirney PC. Erkek üreme sistemi (çeviri: S. Solakoğlu, M. Gültomruk). Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Editörler). Netter temel histoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri;2009.s.378
35. Apa DD, Polat A, Çayan S. İnfertil testis biyopsilerinde fibrozisin vimentin ve alfa düz aktini ile değerlendirilmesi. Türk Ekopatoloji Derg 2002;8(1-2):11-5.
36. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. 3.Baskı, Ankara; Tıp ve Teknik Yayıncılık, 1998:348-50.

37. Eroschenko VP. Di Fiore histoloji atlası. Demir R (çeviri editörü). Palme yayıncılık; 2001:283-6.
38. Govender D, Sing Y. Sertoli cell nodules in the undescended testis: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study of hyaline deposits. *J Clin Pathol* 2004;57:802–6.
39. Michelle KYS, Cheng CY. Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod* 2004; 71(2): 375-91.
40. Skinner MK, Griswold MD. Sertoli cell biology. Elsevier Academic Pres 2005;1-30.
41. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004;25(5):747-806.
42. Fujisawa M. Cell-to-cell cross talk in the testis. *Urol Res* 2001;29:144-51.
43. Fleming SL, Shank PR, and Boekelheide K. gamma-Tubulin overexpression in Sertoli Cells In Vivo. II: Retention of spermatids, residual bodies, and germ cell apoptosis. *Biol Reprod* 2003;69:322–30.
44. Demir R, Gametogenez. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi. Ankara: Palme Yayıncılık,1995;24-34.
45. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek üreme sistemi (çeviri: Y. Aytakin). Aytakin Y, Solakoğlu S (Editörler). Temel histoloji. İstanbul: Barış Kitabevi;1993:497.
46. Jain GC, Jangir RN. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 2014;10(3):147-57.
47. 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.
48. Bener A, Al-Ansari AA, Ziric M, Al-Hamaq AO. Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus. *Int Urol Nephrol* 2009;41(4):777-84.
49. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43.
50. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J, Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto–Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 2006;66:2056–67.

51. Wang X, Gu C, He W, Ye X, Chen H, Zhang X et al. Glucose oxidase induces insulin resistance via influencing multiple targets in vitro and in vivo: the central role of oxidative stres. *Biochimie* 2012;94:1705–17.
52. Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG. The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:887-898.
53. Khaki A, Khaki AA, Hajhosseini L, Golzar FS, Ainehchi N. The anti-oxidant effects of ginger and cinnamon on spermatogenesis dys-function of diabetes rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014;11(4):1-8.
54. Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis hakkında bilinenler. *Düzce Tıp Derg* 2012;14(2):87-101.
55. Cooper DM. The balance between life and death: defining a role for apoptosis in aging. *J Clin Exp Pathol* 2012;001 Suppl 4. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0681.S4-001>.
56. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010;205(2):117-31.
57. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Vet Fak Derg* 2008;(2):73-78.
58. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495–516.
59. Saigusa S, Tanaka K, Ohi M, Toiyama Y, Yasuda H, Kitajima T et al. Clinical implications of Fas/Fas ligand expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Mol Clin Oncol* 2014;3(1):151-6.
60. Karabulut MH, Yılmaz MS, Topal CS, Murtazaoğlu M, Yavuzer D, Karadayı N ve ark. Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında fas, fas ligand ekspresyonu ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi. *ŞEEAH Tıp Bülteni* 2010;44(4):145-51.
61. İnci A, Yıldırım A, Yavuz A, Düzlü Ö. Bazı protozoon enfeksiyonlarda apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2009;6(2):121-133.
62. Li J, Chen F, Chen Y, Wang Z. Mitochondrial- and Fas-L- mediated pathways involved in quineestrol induced spermatogenic apoptosis in adult rat testes. *Toxicol Mech Methods* 2014;24(9):609-15.
63. Topcu-Tarlacalisir Y, Kanter M, Uzal MC. Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Arch Toxicol* 2009;83(8):735-46.

64. Eid NA, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y. Involvement of Fas system and active caspase in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int J Androl* 2002;25(3):159-67.
65. Kushwaha S, Jena GB. Enalapril reduces germ cell toxicity in streptozotocin-induced diabetic rat: investigation on possible mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012;385(2):111-24.
66. Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF- β 1, IL-1 β and Akt signalling. *Cell Biochem Funct* 2014;32(1):115-24.
67. Costanzo PR, Suárez SM, Scaglia HE, Zylbersztejn C, Litwak LE, Knoblovits P. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in eugonadal men with type 2 diabetes mellitus. *Andrology* 2014;2(1):117-24.
68. Mikhailichenko VV, Tiktinskii OL, Sil'nitskii PA, Vorokhobina NV, Aleksandrov VP. The pathogenesis of sexual disorders in men with diabetes mellitus. *Urol Nefrol (Mosk)* 1993;(2):47-50.
69. Gurusubramanian G, Roy VK. Expression of visfatin in alloxan-induced diabetic rat testis. *Acta Histochem* 2014;116(8):1462-8.
70. Altay B, Cetinkalp 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 Suppl 2:828-31.
71. Hess RA, Linder RE, Strader LF, Perreault SD. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat II. Quantitative and qualitative histopathology of the testis. *J Androl* 1988;9(5):327-42.
72. Jin L, Lagoda G, Leite R, Webb RC, Burnett AL. NADPH oxidase activation: A mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. *J Sex Med* 2008;5(3):544-51.
73. Li YJ, Song TB, Cai YY, Zhou JS, Song X, Zhao X et al. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci* 2009;108(2):427-36.
74. Yin Y, DeWolf 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.

75. 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.
76. Wang Y, Zhang Z, Guo W, Sun W, Miao X, Wu H et al. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307(1):14-23.
77. Jiang X, Zhang C, Xin Y, Huang Z, Tan Y, Huang Y et al. Protective effect of FGF21 on type 1 diabetes-induced testicular apoptotic cell death probably via both mitochondrial- and endoplasmic reticulum stress-dependent pathways in the mouse model. *Toxicol Lett* 2013;219(1):65-76.
78. Ramzy MM, El-Sheikh AA, Kamel MY, Abdelwahab SA, Morsy MA. Mechanism of testicular protection of carvedilol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Pharmacol* 2014;46(2):161-5.
79. Zhao H, Xu S, Wang Z, Li Y, Guo W, Lin C et al. Repetitive exposures to low-dose X-rays attenuate testicular apoptotic cell death in streptozotocin-induced diabetes rats. *Toxicol Lett* 2010;192(3):356-64.
80. Mohasseb M, Ebied S, Yehia MA, Hussein N. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2011;67(2):185-94.
81. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999;276:310-6.
82. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997;138(5):2081-8.
83. Ozenci CC, Sahin Z, Ustunel I, Akkoyunlu G, Erdogru T, Korgun ET ve ark. The Fas system may have a role in male reproduction. *Fertil Steril* 2006;85 Suppl 1:1168-78.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Fas/FasL sinyal yolağı	13
Şekil 2: Kontrol grubu, H+E, X100	25
Şekil 3: Kontrol grubu, H+E, X200	25
Şekil 4: Kontrol grubu, H+E, X400	26
Şekil 5: Diyabet grubu, H+E, X100	26
Şekil 6: Diyabet grubu, H+E, X100	27
Şekil 7: Diyabet grubu , H+E, X200	27
Şekil 8: Diyabet grubu , H+E, X200	28
Şekil 9: Diyabet grubu , H+E, X400	28
Şekil 10: Diyabet grubu , H+E, X400	29
Şekil 11: Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X100	29
Şekil 12: Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200	30
Şekil 13: Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X400	30
Şekil 14: Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X100	31
Şekil 15: Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200	31
Şekil 16: Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X400	32
Şekil 17: Kontrol grubu, kaspaz 8, hematoksilen zıt boyaması, X100	32
Şekil 18: Kontrol grubu, kaspaz 8, hematoksilen zıt boyaması, X200	33
Şekil 19: Kontrol grubu, kaspaz 8, hematoksilen zıt boyaması, X400	33
Şekil 20: Diyabet grubu, kaspaz 8, hematoksilen zıt boyaması, X100	34
Şekil 21: Diyabet grubu, kaspaz 8, hematoksilen zıt boyaması, X200	34

Şekil 22: Diyabet grubu, kaspaz 8, hematoksilen zıt boyaması, X400	35
Şekil 23: Kontrol grubu, kaspaz 3, hematoksilen zıt boyaması, X200	35
Şekil 24: Kontrol grubu, kaspaz 3, hematoksilen zıt boyaması, X400	36
Şekil 25: Diyabet grubu, kaspaz 3, hematoksilen zıt boyaması, X200	36
Şekil 26: Diyabet grubu, kaspaz 3, hematoksilen zıt boyaması, X400	37
Şekil 27: Diyabet grubu, kaspaz 3, hematoksilen zıt boyaması, X400	37
Şekil 28: Kontrol grubu, Fas, hematoksilen zıt boyaması, X400	38
Şekil 29: Kontrol grubu, Fas, hematoksilen zıt boyaması, X400	38
Şekil 30: Diyabet grubu, Fas, hematoksilen zıt boyaması, X200	39
Şekil 31: Diyabet grubu, Fas, hematoksilen zıt boyaması, X400	39
Şekil 32: Diyabet grubu, Fas, hematoksilen zıt boyaması, X400	40
Şekil 33: Diyabet grubu, Fas, hematoksilen zıt boyaması, X400	40
Şekil 34: Kontrol grubu, FasL, hematoksilen zıt boyaması, X200	41
Şekil 35: Kontrol grubu, FasL, hematoksilen zıt boyaması, X400	41
Şekil 36: Kontrol grubu, FasL, hematoksilen zıt boyaması, X400	42
Şekil 37: Diyabet grubu, FasL, hematoksilen zıt boyaması, X200	42
Şekil 38: Diyabet grubu, FasL, hematoksilen zıt boyaması, X200	43
Şekil 39: Diyabet grubu, FasL, hematoksilen zıt boyaması, X400	43

Tablolar

Tablo 1. Kan glukoz düzeyi değerleri	19
Tablo 2. Vücut ve testis ağırlığı değerleri	20
Tablo 3. Seminifer tübül çap ölçümü değerleri	21
Tablo 4. Apoptotik tübül ve hücre indeksleri	22
Tablo 5. Kaspaz 8, kaspaz 3, Fas ve FasL değerlerinin karşılaştırılması	23

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Siirt'in Baykan ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğretimini İstanbul ve Siirt'te tamamladıktan sonra, 2007 yılında başladığı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

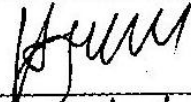

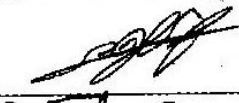
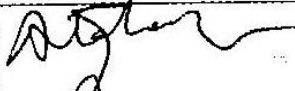
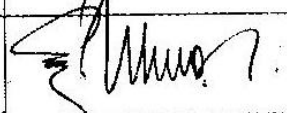
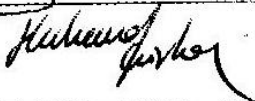
EDİRNE

Oturum Sayısı: 05

Karar Tarihi: 11.07.2013

KARAR NO: 2013.05.05

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın yaptığı Biol. Şinasi BAYRAM'ın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2013/52 protokol nolu "Fas/FasL Yolağının Diyabetik Erkek İnfertilitesindeki Rolünün Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabilmesine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir..

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