

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY

**DENEYSEL DİABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN
TESTİS DOKULARINDA MAPK
İMMÜNREAKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ

EDİRNE – 2010

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülnur KIZILAY

**DENEYSEL DİABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN
TESTİS DOKULARINDA MAPK
İMMÜNREAKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ

Destekleyen Kurum : Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-2008/116

Tez No :

EDİRNE – 2010

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç.Dr.Gülnur KIZILAY'ın danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ tarafından tez başlığı "Deneysel Diabet Oluşturulmuş Sıçanların Testis Dokularında MAPK İmmünreaktivitesinin İncelenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 22/07/2010 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Unvanı Adı Soyadı
Doç.Dr. Gülnur KIZILAY

İmza
Unvanı Adı Soyadı
Yrd.Doç.Dr. Yeşim Hülya UZ

İmza
Unvanı Adı Soyadı
Yrd.Doç.Dr. Selman ÇIKMAZ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

TEŐEKKÜR

Eğitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen sevgili aileme ve eŐime minnettarım. Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni yetiŐtiren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalıŐmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen, tez danışman hocam Doç. Dr. Gülnur KIZILAY'a, araŐtırmam süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet KANTER ve Yrd. Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. İstatistik konusunda yardım aldığım Doç. Dr. Necdet Süt ve Yrd. Doç Dr. İmran KURT ÖMÜRLÜ'ye, çalıŐmam esnasında yardımlarını esirgemeyen, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
DİABETES MELLİTUS	3
TESTİSİN HİSTOLOJİSİ	4
SPERMATOGENEZ	6
DİABETES MELLİTUS VE ERKEK İNFERTİLİTESİ	8
DENEYSEL DİABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN	10
PROLİFERE HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ	12
MİTOJENLERİN AKTİVE ETTİĞİ PROTEİN KİNAZLAR'IN ETKİNLİĞİ	13
GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
BULGULAR	22
TARTIŞMA	48
SONUÇ	55
ÖZET	57
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	61
ŞEKİLLER LİSTESİ	69
ÖZGEÇMİŞ	72
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

DM	: Diabetes mellitus
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
H+E	: Hematoksilen Eozin
HSCORE	: Histolojik skorlama
IL	: İnterlökin
JNK	: c-Jun NH2-terminal kinaz
JNKK1	: Jun NH2-terminal kinaz aktive edici 1
MAPK	: Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz
MAPKK	: Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz kinaz
MAPKKK	: Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz kinaz kinaz
MKK4	: Mitojenlerin aktive ettiği protein protein kinaz kinaz 4
PCNA	: Prolifere hücre nükleer antijeni
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
STZ	: Streptozotosin
TBS	: Tris tampon solüsyonu

GİRİŞ VE AMAÇ

Çağımızda hızla artan ve toplumda sık görülen Diabetes mellitus (DM), yüksek oranda organ hasarlarına yol açmaktadır. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan DM'nin başlıca semptomları nöropati, retinopati, anjiyopati, impotans, polidipsi, poliüridir(1-5). DM; global dünyanın en büyük sağlık problemlerindendir ve insidansı her geçen gün hızla artmaktadır. 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından sunulan raporlarda, günümüzde dünyada 177 milyon kişinin DM'den etkilendiği, ancak bu sayının 2025 yılında yaklaşık 300 milyon kişiyi bulacağı bildirilmiştir. Bu artışın en büyük sebeplerinin; obezite, yaşam sürelerinin uzaması ve aktivite azalması olduğu bildirilmiştir (6,7).

Diabetin erkek bireylerde sebep olduğu; azalmış testosteron düzeyi ve normal olmayan spermatogenezis, sperm sayısı ve hareketliliğindeki değişiklikler, testis ağırlığındaki azalma, testislerin tunika albugineasında, seminifer tübüllerde, Sertoli hücrelerinde, interstisyel dokuda ve Leydig hücrelerindeki histolojik değişiklikler, DM'li erkeklerde sıkça rastlanan bulgulardır (8,9). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, DM'li testis dokusunda apoptozisin arttığı ve bundan dolayı da spermatogenezisde bozulmaların ortaya çıktığı gösterilmiştir (8-10).

Diabetes mellitus'lu erkek ratların Leydig hücrelerinde gözlenen proliferasyon azalması ve hücre harabiyeti, hipofiz-testis ekseninde değişikliklerin meydana gelmesi ve bundan dolayı da testosteron düzeyinin düşmesinin; germ hücrelerinde apoptozise ve normal olmayan spermatogenezise sebep olduğu ileri sürülmüştür (8). Ancak diabetli testis dokusundaki apoptozis mekanizmasına dahil olan proteinlerin rollerine ilişkin çalışma sayısı oldukça azdır (8).

Deneysel DM oluşturulmuş erkek sıçanların testis dokularında görülen hücresel değişiklikler, DM’li insan testis dokularında görülen değişikliklere çok yakındır. Bu nedendir ki; sıçanlarda uygulanan deneysel diabet modelleri, DM’nin sebep olduğu semptomların tedavisine yönelik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (3,8,9,10).

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz (MAPK)’lar; embriyogenezis, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü ile ilgili çeşitli sinyallerin düzenlenmesinde büyük rol oynarlar. Çok hücreli organizmalarda MAPK’lar; 3 alt grubu ile (ERK- Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz; JNK- c- Jun NH2-terminal kinaz/stresin aktive ettiği protein kinazlar (SAPK) ve p38 MAPK) hem fizyolojik hem de patolojik birçok hücresel olayı kontrol ederler (11-20).

Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz; epidermal büyüme faktörleri ve diğer dış mitojenik sinyallere cevap verip, hücre proliferasyonunu destekler. JNK ve p38 MAPK ise strese karşı cevapları ile dikkat çeker ve bu yüzden de “stresin aktive ettiği kinazlar” olarak isimlendirilirler ve çoğunlukla inflamasyon ve apoptozis ile ilgilidirler (11-14,21). Isı, inflamatuvar sitokinler, ultraviyole ışınları, radyasyon, hidrojen peroksit ve osmotik şok gibi çeşitli faktörlere yanıt olarak apoptotik sinyal mekanizmasında görev alırlar (8,11,13,14,21).

Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) olarak bilinen nükleer matriks proteini; hücre siklusunun S ve G2 fazında maksimum salınımindan dolayı DNA sentezi için işaretçidir ve G0 fazında bulunmaz. DM’nin spermatogenezde, proliferasyon üzerine etkisinin incelenebilmesi için, PCNA immünreaktivitesi değerlendirilmelidir (22). PCNA ve MAPK immünreaktivitelerinin karşılaştırılmasının, spermatogenez germ hücre serisine DM’nin etkilerinin açıklanmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Biz bu çalışmada; streptozotosin (STZ) ile deneysel diabet oluşturulmuş erkek sıçanların testis dokularında; MAPK (ERK ve JNK) immünreaktivitelerinde ortaya çıkacak değişiklikleri değerlendirmeyi, böylece DM’li bireylerde normal olmayan spermatogenezis ve apoptozis mekanizmasının aydınlatılmasına ve bu sebeple infertil olan erkek bireylerin tedavi süreçlerine, elde edeceğimiz verilerle destek olmayı planlamaktayız.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, insan sağlığı üzerindeki en önemli küresel tehditlerden biridir. DM; insülin üretiminde veya insülin kullanımındaki yetersizlik sonucu oluşan, yağ, protein ve karbonhidrat metabolizması bozukluğuyla birlikte olan, kronik hiperglisemi ile karakterize, multipl etiyojisi olan bir hastalıktır. Birçok ülkede ölüme neden olan ilk 5 hastalık içerisinde yer alan, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip, kronik ilerleyici metabolik bir hastalık olarak tanımlanır (1,4,23-26).

Diabetes mellitus için kabul gören geniş kapsamlı ilk sınıflama, 1980'de Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanmış ve 1985'de yenilenmiştir. 1980'de yapılan sınıflamada Dünya Sağlık Örgütü Diabetes Mellitus Ekspert Komitesi, diabeti 2 sınıfa ayırmıştır (1,24);

İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus veya Tip I DM

Tip I diabete, pankreasdaki insülin üreten β hücrelerinin otoimmün yıkımı sebeptir. Çocuklukta ve erken yetişkinlik devresinde yaygındır (1,7,23,27,28). Tip I diabetli hastaların büyük çoğunluğu (%90'dan fazla), 30 yaş öncesinde teşhis edilir (6). Tip I diabette, etiyojisi ve patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber, otoimmün nedenler etkilidir. Pankreasta otoimmün olmayan, β hücre yıkımına veya yetersizliğine neden olan spesifik nedenleri kapsamaz (örneğin kistik fibrozis, mitokondrial defektler, vb) (24)

İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus veya Tip II DM

Tip II diabet ise yetişkinlerde yaygındır. Hastalığın gelişiminin altında yatan temel sebepler; pankreas β hücrelerinde azalma, bozulmuş insülin sekresyonu veya insülin direncidir (1,7,23,26,28). Tip II DM, diabetin en sık gözlenen formudur (1,24). İnsülin direnci; eksojen ve endojen insülinin etkileri ile biyolojik yanıtın bozukluğu anlamına gelir ve Tip II DM'nin patofizyolojisindeki en önemli sebeplerden biri olarak yer alır (26).

İnsanların yaşam sürelerinin uzaması, fiziksel aktivitelerinin azalması ve obezitenin artması ile DM insidansı ve prevalansında ciddi anlamda artma olmuştur (7,26). DM; geniş çaptaki yan etkileri ile çoğu organı etkileyen, kronik metabolik bir hastalıktır (4,28). Kan glukozu, plazma lipidleri, keton ve özel metabolitlerin ölçümü gibi parametreler klinik teşhiste en büyük destektir (28).

Klinik olarak karakteristik belirtileri olan; polidipsi, poliüri, görme bulanıklığı ve kilo kaybı ile ortaya çıkabilir. En ağır formu ise ketoasidoz ve hiperosmolar nonketotik komadır. Tedavi edilmezse stupor, koma, hatta ölümlle sonuçlanabilir. DM'nin uzun vadedeki etkileri, progresif gelişen spesifik komplikasyonlara yol açar. Bunlar; mikrovasküler yan etkiler (retinopati, renal yetersizlikle sonuçlanabilen nefropati, nöropati) ve makrovasküler yan etkiler (miyokard infarktüsü, inme, periferik arter hastalığı) olarak 2 grupta incelenebilir. Hipertansiyon ve lipid metabolizması anormallikleri de diabetli bireylerde sıklıdır (5,24).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan iki çalışmada tüm yaş gruplarında diabet prevalansı %7,8'dir (23,6 milyon kişi) ve her yıl 1,3 milyon yeni vaka saptandığı ifade edilmiştir (29,30).

Onat ve arkadaşları tarafından 1990 yılında gerçekleştirilen Türk erişkinlerinde kalp hastalıkları ve risk faktörleri (TEKHARF) çalışmasında, toplumumuzda diabet prevalansı, erkeklerde %8,1 ve kadınlarda %8,9 olarak açıklanmıştır. Çalışmanın 2001 yılındaki güncellemesinde ise DM prevalansının, geçen 10 yıl içinde her yıl ortalama %6,7 oranında arttığı anlaşılmıştır (31).

TESTİSİN HİSTOLOJİSİ

Erkek genital sisteminin en önemli bölümü olan testisler, haploid erkek gametlerin (spermatozoa [tekil spermatozoon] veya sperm) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından, erkek seks hormonlarının (androjenler) sentezi ve sekresyonundan sorumlu olan, ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan bir çift organdır (32-34).

Kapsülün en dış tabakası olan tunika vajinalis; dışta pariyetal içte ise visseral bir tabakadan oluşup, testisin ön ve yan kısımlarında orta tabaka olan tunika albuginea adı verilen sıkı ve düzenli bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir (33,35). Tunika albugineanın derin kısmı, kan damarlarından zengindir ve burada gevşek bağ dokusu özelliğinde tunika vasküloza yer alır. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak, mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur (36,37).

Her bir seminifer tübül; yaklaşık 150-250 µm çapta ve 80 cm uzunlukta, iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Tunika vaskülozadan köken alan gevşek bağ dokusu, bu tübüller arası boşluğu doldurarak interstisyel bağ dokusunu oluşturur (36). İnterstisyel alan, testis kütlelerinin %25-30'unu oluşturur ve kabaca intertübüler ve peritübüler alan olarak ikiye ayrılabilir. İntertübüler alanda Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, periferik sinir, makrofajlar ve mast hücreleri bulunur. Her tübülün çevresinde tübülü saran lamina propria ve arada bazal membran bulunur. Lamina propriada; kollajen lifleri içeren iç hat ve içsi hücrelerden zengin dış hat vardır. Bu hücrelerin kollajen üretme ve kasılma özellikleri vardır. Seminifer tübül çevresinde içte 3-5 tabaka miyofibroblast, dışta ek olarak 1-2 tabaka fibroblast bulunur (38). Burada, kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücreleri (epiteloid interstisyel hücreler) yer alır. Leydig hücreleri; interstisyel bağ doku içerisinde, kan kapilleri etrafında, tek ya da gruplar halinde bulunurlar. Şekilleri yuvarlak veya çok köşeli olup merkezde yerleşik bir ya da iki nükleusları bulunur ve testosteron sentezlerler (32,37,39).

Seminifer tübül; iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş çok katlı germinal epitel ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur. Bu hücreler: destek (sustentaküler) veya Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler veya germ hücrelerinden (spermatogonyumlar, spermatosit-I, spermatosit-II ve spermatid) oluşur. Burada olgunlaşan spermatogenik hücreler, spermlere dönüşürler (32,39).

Spermatogonyumlar ile Sertoli hücrelerinin yan yana birlikte oturduğu bazal membranın büyük çoğunluğu, ekstraselüler matriksten oluşur. Ekstraselüler matrikste; tip IV kollajen, laminin, fibrinojen, heparan sülfat, proteoglikanlar ve entaktin bulunur (34,40-42).

Sertoli hücreleri, spermatogenezde anahtar rol oynarlar (43). Görevleri kısaca;

- Gelişmekte olan spermatogenez seri hücrelerine destek olmak, korumak, beslenmelerini sağlamak,

- Spermiyohistogenez geçiren spermatidlerdeki fazlalık sitoplazmayı (artık cisim) fagosite etmek ve olgun spermin seminifer tübüllerin lümenine atılması (spermiasyon),
- Transport proteinleri olan androjen bağlayıcı protein, retinol bağlayıcı protein, seruloplazmin, transferrin, sülfat glikoprotein, laktat, prüvat, östrojen gibi metabolitleri, transforme edici büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü-I, interlökin (IL)–1 gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini, plazminojen-aktivatör gibi proteazları, inhibin, aktivin, müller kanalını inhibe edici hormon, sülfat glikoprotein–2 gibi regülasyon proteinlerini salgılayarak, spermin beslenme ve nakli için gerekli testiküler sıvının salgılanması,
- Oluşturdukları bariyer ile gelişen spermatogenik hücreleri, immünolojik saldırılardan korumak ve testosteronu östradiol haline çevirmektir (33,36,39,44).

SPERMATOGENEZ

Spermatogenezis çeşitli faktörlerin etkisi altında olan dinamik bir süreçtir. Germ hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında oldukça organize basamaklar içeren bu süreç, fonksiyonel sperm üretimiyle sonuçlanır, erkek germ hücrelerinin gelişmesi ve olgunlaşmasıdır (20,36,44-46). Spermatogenez;

- 1- Spermatositogenez=Çoğalma,
- 2- Mayoz=Büyüme,
- 3- Spermiyohistogenez= Olgunlaşma olmak üzere 3 evrede gerçekleşir (44).

Çoğalma Dönemi

Doğum öncesi evrede, seminifer tübüllerin duvarındaki spermatogonyumlar, normal somatik hücrelerde gözlenen mitoz bölünme ile bir seri bölünme geçirirler ve belli bir düzeye ulaştınca o bölgedeki spermatogonyum bölünmesi durur. Maturasyondan önce, geç fetal dönemden puberteye kadar spermatogonyumlar testislerdeki seminifer tübüllerde inaktif olarak kalır. Çoğalmaya yönelik bölünme, postnatal dönemde de sürer (44,47).

Spermatogenik hücre serisinin ilk evresini oluşturan spermatogonyumların olgunlaşma süreci pubertede başlar (47).

Pubertede spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir. A Tipi spermatogonyumlar olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da süre giden mitotik

sikluslar boyunca farklılaşarak, B Tipi spermatogonyumları oluştururlar. B Tipi spermatogonyumlar seminifer tübüllerdeki en büyük çaplı hücre olan spermatosit-I'lere farklılaşan öncül (progenitör) hücrelerdir (36,47). Somatik mitozla artık bölünmeyen hücre türü, çoğalma döneminin son ürünüdür ve bu nedenle bu hücrelere spermatosit-I denir (36,44).

Büyüme Dönemi

Kan testis bariyerinin üstünde kalan adluminal kompartmanda yer alan spermatosit-I hücreleri, mayoz bölünmeye girerler. Mayoz bölünme; birbirini izleyen; mayoz-I (indirgenme bölünmesi) ve mayoz-II (eşitlenme bölünmesi) olmak üzere iki aşamadan meydana gelir (36,44,47,48).

Spermatosit-I'ler 46 kromozom (44+XY) ve mayoz öncesinde DNA'larını replike ettikleri için 4n DNA içerir (n haploid kromozom sayısını [insanlarda 23 kromozom] ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını gösterir) (44). Oluşmalarından hemen sonra adluminal kompartmandaki bu hücreler, birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Leptoten ve pakiten evrelerini birinci mayotik bölünme mekiğinin oluşumu izler (metafaz I). Spermatosit-I'ler, spermatogenik serinin en büyük çaplı hücreleridir ve nükleuslarında kangal oluşturma sürecinin değişik safhalarında kromozomlar bulunması ile tanınırlar (36,48).

Birinci mayoz bölünmeden sonra yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) ve 2n DNA içeren iki adet spermatosit-II oluşur. Spermatosit-II'lerin bölünmesi; 23 kromozom içeren 2 hücreden, dört adet haploid kromozomlu spermatidlerin oluşumuyla sonuçlanır. İkinci mayoz bölünme sırasında, kromozom miktarında azalma olmaz. Spermatositlerde birinci veya ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediği için, ikinci mayoz bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (n) hücreler meydana gelir. Böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenme ile bunlar normal diploid (2n) sayıya dönerler (36,37,47,48).

Birinci mayoz bölünme, gerçek redüksiyon bölünmesidir. İkinci bölünme tıpkı somatik mitoz bölünme gibi gelişir ve sonuçlanır. İkinci mayoz bölünmeyi, spermatosit-II hücreleri geçirir. Çoğalma sonucu oluşan her bir spermatositten, dört yeni hücre oluşur ve bunlar spermatid olarak isimlendirilir (37,44).

Spermatidler artık bölünmezler, haploid sayıda kromozom, ana hücrenin yarısı oranında kromozom taşır ve bu aşamadan sonra olgunlaşma dönemine girerler. Büyüme

döneminde esas olan işlem mayoz olduğu için, bu döneme “mayoz evresi” veya “redüksiyon evresi” de denir (37,44).

Olgunlaşma Dönemi

Spermatozoid-II'lerin bölünmesi sonucu oluşan spermatidler, olgun değildirler. Olgun sperm oluşması için, spermatidler başlarını, Sertoli hücrelerinin sitoplazmik katlantıları arasına sokarak beslenir, korunur, farklılaşır ve olgunlaşırlar (44).

Spermiyohistogenez, spermatogenezin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan sperme dönüşme sürecidir. Spermiyohistogenez; golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı, olgunlaşma fazı olmak üzere dört etapta gerçekleşir. Spermatidin histolojik bir farklılaşma geçirdiği, hücre bölünmesinin olmadığı bir safhadır. Bu dönüşüm sırasında sperm nükleusu yoğunlaşır, golgi aparatından oluşan bir vezikül olan 'akrozom vezikülü' yoğunlaşmış hücre nükleusunun üzerine örter ve akrozomu oluşturur. Sentriyol 9x2+2 mikrotübüllü bir flagellum oluşturacak şekilde gelişir. Mitokondriler, oluşacak spermilerin boyun kısmında toplanırlar ve merkezi flaman etrafında bir halka oluştururlar. Sitoplazma fazlası artık cisim (rezidüel cisim) olarak atılır ve spermilerin kuyruk filamanına yapışık durumda kalabilir (44,47,48).

DİABETES MELLİTUS VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Endüstriyel toplumlarda özellikle genç erkek bireylerin üretken olabildiği yıllar esnasında ve öncesinde, giderek artan hem Tip I hem de Tip II DM prevalansının, erkek fertilitésinin azalışı ile ilgili olduğu zannedilmektedir (28).

Diabetes mellitus, spermatogenezin normal işleyişini (endokrin kontrolle veya direkt olarak) bozabileceği gibi penil ereksiyon ve ejakülasyonu da etkileyerek, erkek üreme fonksiyonlarını zayıflatmaktadır. DM gibi sistemik hastalıkların insidansındaki artışın, son 50 yıldaki semen kalitesindeki düşüşü tetiklediği düşünülmektedir (6).

Yüksek kan glukoz düzeyi ile güçlenen uzun dönem kontrolsüz DM, oksidatif stres artışıyla glukoz otooksidasyonuna sebeptir. Elektron transport zincirleri vasıtasıyla DM'de reaktif oksijen türlerinin (ROS) yani serbest radikallerin aşırı üretimi söz konusudur (4). Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi

hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (2).

Serbest radikallerin doku hasarına neden olması, DM patogenezinde ve yan etkilerinde önemli bir faktördür (25).

Anormal kromatin organizasyonu infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre daha sık görülmektedir. Sperm kromatin hasarının oluşmasına sebep olan üç mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bunlar;

- Spermatogenez süresince oluşan defektif kromatin yoğunlaşması, yani protamin gen kompleksindeki değişiklikler,
- Artan apoptozis,
- Reaktif oksijen türleridir (49).

İnfertil erkeklerde; sperm anomalileri, kötü paketlenen DNA, artan DNA zincir kırıkları ve asitle indüklenen DNA denatürasyonuna olan duyarlılık fertil erkeklerin spermelerinde görülenden daha fazladır (49).

Seksüel disfonksiyon; erkeklerde ve deney hayvanlarında yapılan modellerde sıklıkla diabetle bağlantılıdır ve bu yüzden infertilite, diabetli erkeklerde yaygın yan etki olarak benimsenir (8,10,50). Diabetik ratlar; testiküler ağırlık, sperm yoğunluğu ve testosteron düzeyinde azalma ve sıklıkla anormal spermatogenezde artış sergiler. Böylece diabette, testiküler germ hücre apoptosisi artar ve bu da testiste disfonksiyona sebeptir (8,10).

Memelilerde spermatogenik seri hücrelerinin ortaya çıkması esnasında, farklılaşmış spermatogenik hücrelerin yarısından fazlası sperme dönüşmeden önce ölür, büyük olasılıkla bu apoptozisten dolayıdır (51). Apoptozisde en önemli değişiklikler, hücrelerin nükleusunda izlenir. Kromatin nükleus membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çökerek kondanse olur. Elektron mikroskop ile incelendiğinde; kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde, nükleus membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Nükleus da hücre gibi büzülür. Bazen membranla sarılı olarak, birkaç parçaya ayrılabilir. Işık mikroskopik seviyede apoptozis, hematoksilen+eozinle (H+E) boyanmış kesitlerde; hücreler koyu eozinofilik, sitoplazmik tomurcuklu, bir veya birkaç parçalı piknotik nükleuslu olarak izlenebilir. Nükleus kromatininin, nükleus membranın iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarım ay şeklinde izlenebilir (45,52,53).

Diabetik insan ve deney hayvanı testiküler biyopsilerinde; tübül duvarında kalınlaşma, germ hücrelerinde tükenme ve Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon gözlemlenmiş (22) ve ayrıca DM'nin; spermatogenez, penil ereksiyon ya da ejakulattaki bozulma ile

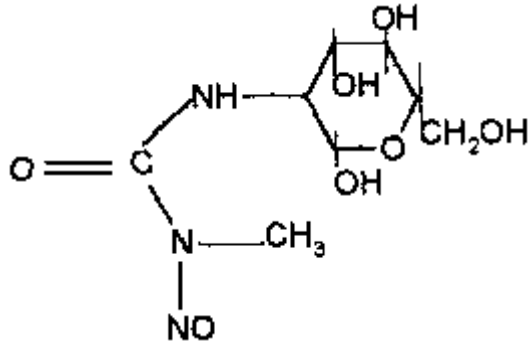
spermatogenezisin endokrin kontrolünü etkileyerek, erkek üreme fonksiyonlarını azalttığı ileri sürülmüştür (6).

Deneysel diabet oluşturulan sıçanlarda ortaya çıktığı ileri sürülen testiküler disfonksiyona, hipofiz LH sekresyonundaki bozukluk ve Leydig hücrelerinden azalmış testosteron salınımının sebep olduğu bilinmektedir (8,54).

DENEYSEL DİABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN

Streptozotosin, (2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucoopyranose) toprakta bulunan *Streptomyces achromogenes* isimli bir mikroorganizma tarafından sentez edilir (3,55,56). 1960'da izole edilmiştir (3). Formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ olan ve başlangıçta antibiyotik, antitümöral ve karsinojenik özellikleriyle bilinen ajan, 1963'de köpek, kedi ve ratlarda diabetojenik etkili bir madde olarak tanımlanmıştır. STZ, glukoz molekülüne bağlı, metilnitroziüre türevi alkilleyici bir ilaçtır (3,16,50,56,57). Katı halde yapısındaki glukoz molekülünün konumuna göre α ve β izomerlerinin karışımı şeklindedir. Katı halde sabit değildir ve dondurulmuş olarak saklanması gerekir, ışıktan korunmalıdır. Optimum stabilitesi için pH 4-4,5 olmalıdır (3). Moleküler ağırlığı 265,2 kilodaltondur (kDa). Beyaz ve açık sarı arasında değişen renkte bir tozdur (16). STZ, pankreas β hücrelerine direkt etkisiyle toksiktir. Yapısında bulunan bir glukoz molekülü sayesinde; plazma membranındaki glukoz taşıyıcılarına bağlanır, molekül nitrozoüre bölümünden ayrılır ve hücre içine girerek toksisite gösterir, glukozla yapılan insülin salıverilmesini bloke eder. Ancak pankreas β hücrelerine etkisi, daha çok intraselülerdir. STZ'nin pankreas β hücreleri içindeki temel etki yeri, nükleer DNA'dır (3,56). STZ ile oluşturulan diabetlerde, hasarlanmış pankreatik β hücreleri yetersiz insülin salınımına sebep olur (3,56,58).

Deneysel hayvan çalışmalarında, insanlardakine benzer DM oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi, D-glukozamin yapısındaki STZ; oksidan maddeler meydana getirerek pankreas Langerhans adacıklarını seçici olarak tahrip ederek, DM'yi başlattığı düşünülmektedir (2,8,55). Hücre içinde STZ dekompozisyona uğrar, bu sırada oldukça reaktif karbonyum iyonları oluşur ve bu iyonlar DNA bazlarında alkalizasyonuna neden olduğu için, olayı DNA tamir dönemi izler. Bu sırada çekirdek enzimi olan poli(ADP-riboz) sentetaz, aşırı miktarda aktive olur. Bu enzimin hücresel aktivitesi sırasında nikotinamid adenine dinükleotid, fazla kullanılıp depoları boşalır ve sonuçta tükenerek hücre ölümüne neden olur (3). STZ, hem Tip I hem Tip II DM'yi indüklemeye kullanılan bir materyaldir (55).



Sekil 1. STZ'nin kimyasal yapısı (3)

Streptozotosin birkaç farklı dozda verilebilir. Bazı uygulamalarda immün mekanizma aktivasyonu aracılığında Tip II DM'yi indükler, farelerde baskın olarak kullanılır. Sıklıkla yetişkin ratlarda Tip II DM'yi indüklemeye intravenöz, 40–60 mg/kg, arasında tek doz kullanılır. STZ intraperitoneal olarak verilirse de aynı etkiyi oluşturur, ancak tek doz, 40 mg/kg altında etkisiz olabilir (55,59).

Streptozotosinin subdiabetojenik tekrarlanan dozlarda kullanımı (5 gün süre ile 40 mg/kg/gün), insanlarda görülen Tip I diabetin deneysel hayvan modelini oluşturmaktadır. Bu ilk defa Like ve Rossine (1976) tarafından Charles River CD-1 farelerine uygulanmıştır. Bu modelde pankreasta görülen değişiklikler, tek doz uygulamasında görülenden farklıdır. Diabet oluşumu, hücrel immün yanıtın rol oynadığını kanıtlar şeklindedir. Bu nedenle Tip I insan diabetine yakın bir model olarak kabul edilir (3,22).

β hücrelerindeki aktivasyonu, kandaki insülin ve glukoz konsantrasyonundaki karakteristik değişikliklere eşlik eder. Enjeksiyondan 2 saat sonra kandaki insülin düşüşüyle birlikte kan şekeri yükselir (hiperglisemi). Bu geçici hiperglisemi; karaciğerde glikojenin ani yıkımına bağlıdır ve diabetojenik ajanı uygulamadan önce hayvan 12-18 saat süreyle aç bırakılırsa azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Hiperglisemik dönemde plazma insülin düzeyleri düşüktür. Hepatik oksijen yıkımının, epinefrin salınmasının bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. STZ uygulamasından yaklaşık 6 saat sonra, kan insülin düzeyindeki artışla hipoglisemi oluşur. Genellikle diabetojenik ilaç uygulamasını izleyen ilk 24 saat içindeki ölümlerden, hipoglisemi sorumludur. Hipoglisemi, β hücrelerinin kaybıyla birlikte, aşırı miktarda insülin salınmasına bağlıdır; bu dönemde plazma insülin düzeyleri çok yükselmiştir. Üçüncü faz 10.-12.saatte başlar ve hiperglisemi dönemidir, plazma insülin seviyeleri artık düşmüştür (55,60). Bedoya ve arkadaşları; kan glukoz ve insülin konsantrasyonundaki bu değişikliklerin, β hücre fonksiyonundaki bozuklukların uyarıcısı

olduğunu ileri sürmüşlerdir (61). STZ'nin glukoz oksidasyonunu bozabileceği, bu durumun insülin biyosentezini ve sekresyonunu azaltabileceği bildirilmiştir (62). STZ'nin β hücrelerinin tamamen ortadan kalkmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (54,55,60). Bu geçici ya da geri dönüşümlü olarak ortaya çıkabilir ve bunu kalıcı hücre hasarı ya da kaybı da izleyebilir (54,60).

Streptozotosin'in, pankreasta serbest radikal süpürücüsü olan süperoksit dismutazı inhibe ettiği ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu, β hücrelerini yıkıma uğrattığı düşünülmektedir (63,64,65).

Streptozotosin; DNA kol kırıkları, kromozal bozukluğu, kardeş kromatin değişimini ve memeli hücrelerinde DNA hasarını uyaran güçlü bir alkali ajan olarak bilinir (50). STZ'nin hücre içi aktivasyonu, pankreatik β hücrelerinde DNA kırılmalarıyla sonuçlanır (66). DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon, dal kırıklarıdır (67). STZ'nin serbest radikalleri ürettiği bulunmuştur ki, bu da DNA kırığına katkıda bulunur ve hücrede diğer değişiklikleri akla getirir (50,66).

Süperoksidanların oluşumu da mitokondrideki STZ hareketliliğiyle sonuçlanır. STZ'nin; krebs siklusunu inhibe ettiği ve mitokondri tarafından oksijen tüketimini çok azalttığı gösterilmiştir. Bu etkiler, mitokondrial ATP üretimini sınırlayıcıdır ve β hücre nükleotidlerinin tüketim sebebidir. Mitokondrial ATP üretimi sınırlanmasına, kısmen nitrik oksit aracılık eder (66).

PROLİFERE HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ (PCNA)

Prolifere hücre nükleer antijeni; moleküler ağırlığı 36-kDa olan hücre siklusu ile ilgili nükleer matriks proteindir (22,68). PCNA, hücre siklusunun proliferasyon fazını görüntülemek için kullanılan bir antijendir (69). Hücre kinetiğini ölçmede güçlü ve germ hücrelerinin proliferasyon aktivitesinin değerlendirilmesinde ucuz, basit ve doğru bir yöntemdir (22).

DNA sentezini katalize eden, DNA onarımında rol alan DNA polimeraz δ proteinini içerir (22,53,69). Sentezi; hücre siklusunun geç G fazında başlayarak, orta-geç S fazında en yüksek değere ulaşmaktadır ve bu fazlarda hücre nükleusunda bulunmaktadır (53,68,69). Hücre siklusunun S ve G2 fazında aşırı salınımından dolayı, DNA sentez belirtecidir. Yalnızca G0 fazında yoktur. Yarılanma süresi 20 saattir.

Proleptoten, leptoten ve pakiten evrelerinde hücre nükleusuyla tepkimeye girer, ancak Sertoli hücre nükleusları bu tepkimeden etkilenmezler (22).

Prolifere hücre nükleer antijeni, hücrede iki çeşit immunreaktivite şekli gösterebilir. Granüler reaksiyon, muhtemelen replizoma bağlı PCNA kaynaklıdır. Sitoplazmik reaktivite ise mitotik hücrede saptanmaktadır. S fazında granüler PCNA immunreaktivitesi, alt fazlara göre farklılıklar göstermektedir. Erken S fazında nükleusta, dağılımı homojen olmayan küçük noktacıklar şeklinde izlenir. Bu noktalar, nükleus periferinde ve perinükleoler kısımda bulunmazlar. Muhtemelen çok sayıda replizom demetleri bulunduran, replikom bölgelerine bağlıdır. S fazına ilerledikçe, noktacıklarda belirgin artış vardır. Daha sonra nükleus periferinde ve perinükleoler alanda da noktacıklar izlenir. S fazının sonlarına doğru, noktacıkların sayısında ve boyutlarında artış olmaktadır. Bunun nedeni, geç replike olan heterokromatin yaklaşmasıdır. S fazının sonunda ise DNA replikasyonu olmaktadır ve noktacıklarda artış sınırlı sayıdadır (70).

Spermatogenezin etkinliği; spermiyohistogenez, mayozdaki germinal hücre kaybı ve spermatogonyum proliferasyon aktivitesine bağlıdır. PCNA, germinal hücre kayıplarının teşhisinde kullanılır. Çünkü geminal hücre kaybında, özellikle PCNA düzeyi azalmış ve DNA sentezinde bozulma uyarılmıştır. Ayrıca PCNA, DM'nin spermatogenez üzerine etkilerinin, histopatolojik bulgularla doğrulanmasında ve germ hücre kinetiğinin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (22).

MAPKİNAZLAR'IN ETKİNLİĞİ

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz (MAPK) yolağı denilince; mayadan insana kadar tüm ökaryotik hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu, MAPK süper ailesinde yer alan bir dizi protein kinaz anlaşılır (17,71). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler, hücre membranından nükleusa bilgi aktarılmasında önem taşımaktadırlar (17). MAPK'lar seri yollar boyunca aktive olabilen ve eksojen uyarılara yanıt olarak oluşan gen ifadesini ve hücre fonksiyonunu düzenleyen önemli sinyal iletim proteinleridir (14,72). Bu yolağın elemanları; çok sayıda büyüme faktörü ve sinyal iletimi molekülü uyarımına yanıt olarak aktive olan, MAPK denilen bir protein-serin/treonin (Ser-Thr) kinaz ailesidir (71).

Memeli hücrelerinde geleneksel olarak MAPK ailesi;

- ERK (ERK1 ve ERK2),
- p38-MAPK (p38-MAPK α , p38-MAPK β , p38-MAPK γ , p38-MAPK δ),
- JNK (JNK1, JNK2 ve JNK3) olmak üzere 3 gruptan oluşmaktadır (11-20).

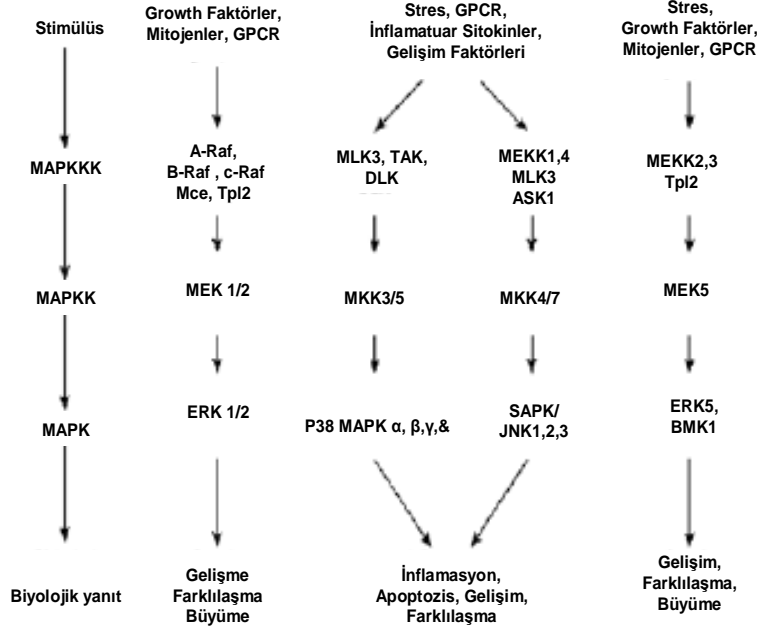
Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz kinazlar (MAPKK), substratları olan MAPK'leri serin/treonin kinazlar üzerine gönderilen uyarılarla serin ve/veya treonin aminoasitlerinden fosforile ederler (13,18,19). MAPK'ler tripeptid Thr-Xaa-Tyr (treonin-Xaa-tirozin) yapısının fosforilasyonu vasıtasıyla aktive olurlar. Her bir gruptaki tripeptid yapı dizinleri, ERK'da Thr-Glu-Tyr (treonin-glutamin-tirozin); p38'de Thr-Gly-Tyr (treonin-glisin-tirozin); ve JNK'da ise Thr-Pro-Tyr'e (treonin-prolin-tirozin) farklılaşır. Korunan protein kinaz yolları vasıtasıyla, treonin ve tirozinin fosforilasyonuna aracılık ederler (73).

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz sinyal yolu iletimi, G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla, MAPKK ve MAPK aktive olur (14,17,18,20,45,73). MAPK'ler, sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleustaki transkripsiyon faktörlerini, fosforilasyon yoluyla aktive ederler ve hücre biyolojik yanıtını oluştururlar (17). Uyarılara bağlı olarak MAPK yolağındaki aşağı akım (downstream) faktörleri tarafından indüklenen hücresel yanıtlar, antiapoptotik veya proapoptotik genlerin aktivasyonu yoluyla hücrenin kaderini belirlerler (72). Aktif MAPK enzimleri, gerektiğinde MAPK fosfatazlar tarafından defosforilasyonla inaktive edilmektedirler (74).

Sayılan MAPK alt grupları, G proteine bağlı reseptörler, fosfolipaz C ve iskemi gibi hücresel stres oluşturan faktörler tarafından aktive edilirler (16). MAPK'lar birçok uyarıya yanıt olarak hücre membranına ya da nükleusa sinyaller gönderirler (13). Genel olarak MAPK'lar; nükleusta özgül genlerin transkripsiyonunu ve/veya ribozomlarda gerçekleşen translasyonu stimüle edebilirler, ayrıca bazı yapısal faktörlerin aktivasyonunu sağlayabilirler (16,20). MAPK sinyal yolları; hedef hücrelerde gen aktarımı, mitoz, proliferasyon, farklılaşma, hipertrofi, morfolojik değişimler, apoptozis, glikojen ve küçük ısı şok proteinlerinin sentezinin artırılması ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi gibi olaylara aracılık ederler (12,13,16,17,19,20,45).

Hem JNK hem de p38 MAPK; DNA zararı, ısı değişimi, iskemi, inflamatuvar sitokinler, ısı, stres, radyasyon, oksidatif stres gibi değişikliklerle, çeşitli hücresel ve çevresel streslere yanıt olarak eşzamanlı aktifleşirler (12-14)

Mitogen-Activated Protein Kinase Sinyal Yolu



Şekil 2. MAPK sinyal yolağı (75)

JNK Yolağı

Bu yolak JNK'nın; hücre gelişimi, farklılaşması, dönüşümü ya da apoptozunu kapsayan etkili bir kontrol sürecidir (12,13,76). JNK'lar, stresin aktive ettiği protein kinazlar (SAPK) olarak da adlandırılmaktadırlar. Hücre yaşam ve ölümünü düzenlediği gibi, hücre göçünün kontrolünde de önemli bir yolaktır (15,76). JNK yolağı; mitojen aktive edici protein kinaz kinaz 4 (MKK4) ve MKK7 tarafından aktifleştirilir (15,18,76).

JNK treonin ve tirozin alanları, MKK4 ve MKK7 (SEK1/JNKK1 ve SEK2/JNKK2 olarak da bilinir) yoluyla katalizlenen fosforilasyon reaksiyonu vasıtasıyla aktifleştirilir (13). JNK aktivasyonu; ultraviyole ışınları, protein sentez inhibitörleri, hiperosmolarite, toksinler, iskemi/reperfüzyon, ısı şoku, antikanser ilaçlar (sisplatin, adriamisin ya da etoposid), seramid, T-hücre reseptör sitünilasyonu, peroksid ya da tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi birçok strese karşı yanıt oluşturarak apoptozisi tetikler (12,13). JNK'nın sürekli aktivasyonu sonucu apoptozis meydana gelir (72).

ERK Yolağı

Memeli hücrelerinde ilk olarak MAPK'lardan, ERK üyesi tanımlanmıştır. ERK yolağının memeli hücrelerindeki rolü; ilk olarak sıçanlarda sarkomalara neden olan tümör

virüslerinin onkojenik proteinleri olarak tanımlanmış olan Ras proteinleri çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. ERK yolağı büyüme faktörleri ile aktive olur. ERK aktivasyonu; protein-treonin kinazlar veya G proteinleri-eşlikli reseptörler aracılı büyüme faktörü ile uyarılıp, hücre proliferasyonunda önemli rol oynarlar (71). Hücre yaşamının devamı, hücre proliferasyonu, farklılaşması, aktin iskeleti reorganizasyonu ve hücre göçünü etkilerler (13,77). ERK'nın, ERK1 (MKK1) ve ERK2 (MKK2) ile aktive olduğu bilinmektedir. ERK1 ve ERK2; proliferasyon sinyali iletiminin “olmazsa olmaz” elemanlarıdır (15). Proliferasyon sinyali iletiminde; ERK1/ERK2 ve p38-MAPK arasında negatif düzenleyici etkileşim olduğu bildirilmiştir. ERK'ların aktive olduktan sonra, hücre nükleusuna geçtikleri ve burada bazı transkripsiyon faktörlerini fosforilasyonla aktive ettikleri bilinmektedir (78).

Fosforilasyon; proteinlerde serin, treonin veya tirozin kalıntılarına, bir kinaz enzimi aracılığıyla bir fosfat grubunun eklenmesidir. İnhibisyonunda ise DNA sentezinde duraklama ve bunun sonucunda apoptozis gözlenir. ERK1 ve ERK2 aktivasyonu için, bu proteinde bulunan thr-glu-tyr dizilimindeki treonin ve tirozinin eş zamanlı olarak fosforilasyonu gerekmektedir. Bunlara ek olarak ERK1 ve ERK2, aktivasyonu protein sentezini de aktive eder. MAPK aktivasyonu ve dolayısıyla proliferasyonunun, ayarı veya önlenmesinde ise MAPK fosfatazları rol oynamaktadır (78).

ERK1 ve ERK2 gelişim stimülasyonlarına yanıt olarak aktif olmalarıyla bilinir (13,14). ERK1 ve ERK2'nin aktive olması thr202 ve tyr204'ün eş zamanlı olarak fosforilasyonu ile veya MKKK Raf grubundaki Ras proteini olarak adlandırılan, bir guanilat trifosfat bağlayıcı protein tarafından, büyüme faktörü reseptörleri ile eşleşen iki protein kinaz tarafından düzenlenir (13,14,71). Ras aktivasyonu, MEK (MAPKK) denilen ikinci bir protein kinazı fosforilleyip, aktive edecek olan bir protein-serin/treonin kinaz olan Raf aktivasyonuna yol açar. MEK, ERK ailesi üyelerini bir aminoasit farkla, hem treonin hem de tirozin rezidüllerinden fosforilleyerek aktive eden, iki yönlü özgülüğü olan bir protein kinazdır. ERK aktive edildiği zaman, diğer protein kinazları ve transkripsiyon faktörlerini içeren birçok farklı hedefi fosforiller. Ras'a ilgi 1982'de Ras genindeki mutasyonların, insan kanserlerinin gelişimindeki rolüne ilişkin ipuçları elde edildiği zaman, önemli derecede yoğunlaşmıştır. Ras'ın hücre içi sinyal iletimindeki rolü, Ras proteinin mikroenjeksiyonu ile normal memeli hücre proliferasyonunu, direkt olarak uyardığını gösteren deneyler ile doğrulandı. Bunun aksine, anti-Ras antikoları ya da dominant negatif Ras mutanı ekspresyonu ile Ras fonksiyonlarının engellenmesi, büyüme faktörleri tarafından uyarılan hücre proliferasyonunu bloklamaktadır. Bu yüzden Ras; yalnızca kanser hücrelerinin anormal çoğalma özelliklerini

indüklemekle kalmayıp, normal hücrelerde büyüme faktörü stimülasyonuna yanıt içinde gerekli gibi görünmektedir (71).

Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar; hücre siklusunun G2/M fazında aktive olur. Metafazda tutulan hücrelerde, ERK fosforillenmemiş durumdadır. MEK inhibitörleri ile ERK aktivasyonu bloke edildiğinde; mitoz girişin geciktiği, ardından metafazdan anafaza gecikmeli geçişin mitoz süresinin uzamasına neden olduğu belirtilmektedir. G2/M geçişinde ERK inhibe edildiğinde, M faz süresi iki kat artar. ERK aktivasyon yolları, henüz tam olarak anlaşılammıştır. Hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda DNA hasarı olursa, hücre bu uyarıya düzeyini artırarak yanıt verebilir (53).

p38-MAPK Yolağı

Bira mayasındaki ‘yüksek osmolariteli gliserol’ (Hog1) proteininin memelilerdeki homoloğu, p38-MAPK olarak adlandırılmıştır. Genellikle JNK ile beraber aktifleştiği bilinmektedir. Şimdiye kadar p38-MAPK’ın; p38-MAPK α , p38-MAPK β , p38-MAPK γ , p38-MAPK δ olmak üzere 4 izoformu bulunmuştur. p38MAPK ailesi, inflamatuvar sitokinler ve çevresel stresler tarafından aktive edilirler (13).

p38-MAPK’lar treonin ve tirozin alanlarındaki, MKK3, MKK4 ve MKK6 kinazlar yoluyla fosforile olur ve aktifleştirilir. MKK3 ve MKK6; p38-MAPK aktivasyonu vasıtasıyla proapoptotik sinyaller ortaya çıkarabilir ve bu da apoptozise neden olur (12,13).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunulup, 2008/07.02 nolu karar ile onay alındıktan sonra (Ek 1), Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden, 3 aylık, ağırlıkları 250–300gr arasında değişen 30 adet Sprague Dawley erkek sıçan temin edilmiştir. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerimizden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol grubu (n=10), biri diabet grubu (n=20) olmak üzere 2 farklı grup oluşturulmuştur. Tüm deneklerimiz deney süresince, uygun laboratuvar koşulları altında (22 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda), günlük içme suyu ile beraber %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslenmiştir.

Streptozotosin'in rahat çözünebildiği ve stabilitesini koruduğu bir solüsyon olan sitrat tamponu; 4,1543 gr sodyum sitrat tribazikdihidrat (Merc, A419548, Germany) ve 2,284 gr sitrikasit monohidrat (J.T. Baker, A18592, Austria) 250 ml steril distile suda çözülerek hazırlanmış ve pH'sı 4.2'ye ayarlanmıştır.

Deneklerimizden;

1. Kontrol grubu; sadece pH'sı 4,2 olan 0,1M'lık sitrat tamponu verilen grup (n=8),
2. Diabet grubu; 5 gün süre ile 40 mg/kg STZ (pH' sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda çözülerek) verilen grup (n=12) oluşturulmuştur.

Deneyimizin devam ettiği sürede kontrol grubundan 2 ve diabet grubundan 8 adet denek kaybedilmiştir.

Deneklerin kan-glukoz düzeylerine; deneye başlamadan önce, STZ uygulaması bittikten 2 gün sonra model oluşum kontrolü amaçlı ve sonrasında, deney sonuna kadar 15 günde bir kuyruk veninden alınan kan örneklerinde, glukometre ile bakılmıştır. Aynı zamanda deney başında, her hafta ve deneyin sonunda tüm deneklerimizin vücut ağırlıkları ve yine deney sonunda, her iki testis ağırlıkları ölçülmüştür

Diabet oluşturulduktan 6 hafta sonra, Alfamine (Ketamidol, Alfasan, Hollanda) ve Rompun (Rompun, Bayer, Türkiye) anestezisi altında, tüm deneklerin testisleri total olarak çıkarılıp, ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskobik ve immünohistokimyasal gözlemler için işlemlendirilmiştir.

İmmünohistokimyasal ve ışık mikroskobik rutin boyamalar için; testis biyopsi materyalleri, %10'luk formaldehitte fikse edildikten sonra dokular yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçilmiştir. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck, Darmstadt, Germany) ile muamele edilmiş, önce yumuşak parafin (Merck), sonrasında sert parafine (Merck) alınarak, parafin bloklar elde edilmiştir. Dokulardan histolojik ve stereolojik analizler için alınan 5 mikrometre (μm) kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak H+E boyaları uygulanmıştır. Entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildikten sonra, mikroskopta (Olympus BX51) incelenerek ve değişik büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir.

Aynı preparatların kullanımıyla, tüm deneklerin testis biyopsi materyallerinde seminifer tübül çapları, X20'lik büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak ölçümlenmiş ve bu ölçümler, her hayvandan alınan testis kesitlerinde, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş 10 tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir (22,79).

İmmünohistokimyasal olarak da; PCNA, total ve fosfo (aktif) JNK ve ERK proteinlerinin immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için; 5 μm kalınlığındaki kesitler poli-L-lisin kaplı lamlara alınmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda immünohistokimyasal işlemler uygulanmıştır.

İmmünohistokimya prosedürü için ise; %10'luk formoldahitle fikse edilip, parafine gömülen biyopsi materyallerinden 5 μm 'lik kesitler alınmış ve antijen geri kazanımı için deparafinizasyon sonrası, lamlar 10 mM sitrik tamponunda (pH 6) kaynatılmıştır. Sonrasında kesitler endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için, 5dk. süreyle %3 metanollü hidrojen peroksitte muamele edilmiştir. Mevcut antijenleri bloklamak amacıyla PCNA, tris tampon solüsyonu (TBS) ile hazırlanan normal at serumunda (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), JNK ve ERK ise normal keçi serumunda (Vector Laboratories) 30 dk. bekletilmiştir.

Sonra serum fazlası kesitlerin üzerinden alınarak, parçalar monoklonal fare PCNA (F-2):sc-25280 antikoru (1:200 TBS içinde; Santa Cruz Santa Cruz BioTechnology, USA), poliklonal tavşan SAPK/JNK antikoru ve phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antikoru (1:100 TBS içinde; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), monoklonal tavşan p44/42 MAPK (ERK 1/2) antikoru ve fosfo p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr 202/Tyr 204) antikoru (1:100; TBS ile seyreltildi; Cell Signaling Technology) ve phosphoplus p44/42 kiti içindeki negatif kontrol solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Bunu takiben TBS ile yıkamaların ardından, PCNA için anti-fare (Vector Laboratories), JNK ve ERK için biotinylated anti-tavşan antikoru (Vector Laboratories) 1:400 dilüsyonunda uygulanarak, 30 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir. Parçalar TBS ile yıkandıktan sonra, avidin-biotin-peroksidaz kitle (Vector Laboratories) 30 dk.'lık muamele sonrasında, DAB (3,3-Dia-minobenzidine tetrahydrochloride dihydrate; Vector Laboratories) kullanılarak kromojenize edilmiştir. Parçalara hematoksilinle zıt boyama uygulanarak, alkol ve toluol serilerinden geçirilerek preparatlar kapatılmıştır (21,80,81).

Yapılan tüm immuhistokimyasal işlemlerin sonuçları; histolojik skorlama (HSCORE) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler; preparatların hangi grup hastaya ait olduğunu bilmeyen ve bilen birer değerlendirici tarafından, her preparatta rastgele seçilen beş alanda, x20 objektif kullanılarak yapılmıştır. Skorlama, kesitlerde immünreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin (I x PC; I: boyanma derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) ölçüt olarak alındığı, semikantitatif bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1(zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirilmiştir (21,82).

İstatistiksel analizler için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Merkezi'ndeki S0064 Minitab Release 13 programı (Lisans No: WCP1331.00197) kullanılmış, değerler ortalama \pm standart deviasyon (SD) olarak alınmıştır. $P < 0.005$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Mann-Whitney U testi ile her iki gruptaki deneklerin ilk ve son vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları, kan glukoz (ilk gün, 7.gün ve son gün) düzeylerinde farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Wilcoxon testi kullanılarak, 1. ve 2. grupta deneklerin vücut ve testis dokusu ağırlıkları; Friedman testi ile 1. ve 2. grup deneklerin kan glukozlarının ilk gün, 7.gün ve son gün düzeyleri bağımlı üç değişken olarak kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Deneklerimize ait testis dokusunda oküler mikrometre ile yapılan semifer tübül çapı ölçüm sonuçlarında da, kontrol grubuna göre diabet grubunda anlamlı bir farkın olup olmadığı, Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

HSCORE yöntemi ile değerlendirilen immünreaktivite verileri; Mann-Whitney U testi ile $P < 0.005$ değeri anlamlı kabul edilerek karşılaştırılırken; gruplar arası farklılık ise Wilcoxon testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneklerin total ve fosfo olarak immünreaktivite farklılıkları ise bağımlı iki değişken olarak kendi içinde karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ VE AĞIRLIK BULGULARI

Deneyimize başlamadan önce, tüm deneklerin kan-glukoz düzeyleri ve vücut ağırlıkları kayıt edilmiştir. Oluşturulan kontrol ve diabet gruplarının kan-glukoz düzeyleri; başlangıç, diabet oluşturulduktan sonra ve takip eden her 15 günde bir ölçülmüştür. Ayrıca vücut ağırlıkları deneyin başı ve sonunda, testis ağırlıkları ise deneyin sonunda belirlenmiştir.

Kontrol ve diabet gruplarına ait deneklerin; kan-glukoz düzeyleri Tablo 1’de, başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları ise Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kontrol ve diabet gruplarına ait kan-glukoz düzeyi değerlerinin takibi

	Kontrol Grubu (n=8)	Diabet Grubu (n=12)	P
Kan şekeri ilk (mg/dl)	101±10 104 (88–111)	101±7 102 (90–112)	0,859
Kan şekeri 7. gün (mg/dl)	108±12 109 (90–124)	481±89 483 (371–600)	0,001
Kan şekeri son (mg/dl)	110±7 108 (102–120)	533±66 537 (384–600)	0,001

Deney öncesi ölçülen kan glukoz düzeyi değerlerinde, kontrol ve diabet grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmamıştır ($p=0,859$). Deney sonrası, yani STZ uygulandıktan 2 gün sonra ise diabet grubu kan glukoz değeri, diabet oluşumunu doğrulayacak şekilde (>250 mg/dl), kontrole göre anlamlı derecede yükselmiştir ($p=0,001$). Ayrıca denekler sakrifiye edilmeden önce ölçülen kan glukoz değerleri de deney grubunda, kontrol grubu deneklerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,001$; Tablo 1).

Kontrol grubu ile diabet grubunda yer alacak denekler belirlenirken; özellikle vücut ağırlığı daha yüksek olanlar, diabet grubuna alınmıştır. Bu sebeple diabet grubu deneklerinin deney öncesi ölçülen vücut ağırlıkları, deney grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). Sakrifikasyon öncesi iki grubun vücut ağırlık kıyaslandığında ise diabet grubundaki deneklerin vücut ağırlıklarının, deney süresince kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p=0,001$). Bunun yanısıra, denekler sakrifiye edildikten sonra sağ ve sol testis ağırlıkları, ayrı ayrı ölçüldüğünde ise diabet grubu deneklerinde, kontroldekilere göre anlamlı derecede düşüş belirlenmiştir ($p=0,001$; Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol ve diabet gruplarına ait vücut ve testis ağırlıkları değerleri

	Kontrol Grubu (n=8)	Diabet Grubu (n=12)	P
Ağırlık ilk (gr)	258±3 259 (253–259)	303±27 307 (265–333)	0,001
Ağırlık son (gr)	327±19 325 (311–360)	179±17 175 (160–210)	0,001
Testis (sağ) (gr)	1664±653 1440 (1270–2820)	691±374 641 (305-1296)	0,001
Testis (sol) (gr)	1750±605 1500 (1400-2830)	697±333 684 (355-1025)	0,001

MORFOMETRİK BULGULAR

Deney sonrası kontrol ve diabet grubu deneklerimizin seminifer tübül çapları karşılaştırıldığında; diabet grubu deneklerimizin seminifer tübül çap değerleri, kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p=0,001$).

Tablo 3. Kontrol ve diabet gruplarının seminifer tübül çap değerlerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=8)	Diabet Grubu (n=12)	P
Seminifer tübül çapı (μ)	308±9 310 (294-319)	159±18 168 (130-176)	0,001

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, dıştan tunika albuginea ile desteklenmiş seminifer tübül sınırlarının düzgün olduğu, seminifer tübüleri döşeyen epitelde spermatogenik seri hücreler ile Sertoli hücrelerinin düzenli dizildikleri tespit edildi (Resim: 1).

Seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait hücre dizisi ve lümeninde, kuyrukları lümeneye gelecek şekilde konumlanmış çok sayıda sperm göze çarpmakta idi. Tübüllerin bazalinden lümeneye doğru spermatogenik seri hücrelerinin spermatogonyumlar, spermatosit-I ve II'ler ile spermatidler şeklinde sıralanmakta olduğu izlenmekteydi (Resim: 2).

Spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri bazal lamina üzerine yerleşmişlerdi. Spermatosit-I'ler; belirgin nükleusları, geniş sitoplazmaları ve en büyük çapa sahip spermatogenik seri hücreleri olmalarıyla rahatlıkla ayırt edildi. Spermatidler, lümeneye yakın yerleşen ve koyu boyanan küçük bir nükleusları ve spermler; uzun, iğ şeklindeki nükleusları ile lümeneye izlendi (Resim: 2). Spermatosit-II'ler ise çok sık izlenmemekle birlikte, spermatosit-I'lerin hemen üzerinde konumlanmışlardı. Her bir seminifer tübül, bazal lamina ile çevrelenmişti (Resim: 1 ve 2). Bazal laminanın hemen dış kısmında tek sıralı miyoid hücre dizisi bulunmaktaydı. İnterstisyel bağ dokuda Leydig hücreleri, çeşitli bağ dokusu hücreleri ve kan damarları da ayırt edilmekteydi (Resim: 2). Çoğunlukla poligonal şekilli olan Leydig hücreleri ise düzgün yuvarlağa yakın, oval biçimli nükleusları ve eozinofilik boyanan sitoplazmaları ile normal histolojik yapıda izlendi (Resim: 2).

Diabet grubuna ait ışık mikroskopik bulgular: Diabet grubu bulgularımız, diabetin valığını kanıtlar biçimdeydi. Deneklerimizin seminifer tübüllerinde; Sertoli hücrelerinin uzantıları arasında bulunan spermatogenik seri hücrelerinin diziliminde bozulma, hücre kaybı, organizasyon bozukluğu ve hatta birçok tübülde spermatogenik seri hücrelerinden sadece spermatogonyumların var olduğu gözlemlendi (Resim: 3,4,5,6,7). Sertoli hücreleri ile az sayıda spermatogonyumun oluşturduğu seminifer tübüllerin yanı sıra; spermatogonyum, spermatosit-I, spermatidlerin ve dev hücreleri içeren tübüller bulunmaktaydı (Resim: 4,5,6,7). Ayrıca, germinal epitel hücrelerinin birbirlerinden ve tübüller bazal laminadan ayrıldıkları (Resim: 4,5,6,7) ve tübül çaplarının kontrole göre anlamlı derecede küçülmüş olduğu gözlemlendi

(Resim: 3; Tablo 3). Tübüllerde germ hücre serisine ait bazı germinal epitel hücrelerinin kaybolması ve spermatogenezin bozulması; ayrıca tübüllerin bazal kısmına yakın olarak yerleşmiş bulunan Sertoli hücre dejenerasyonu sebebiyle, germinal epitelde yer yer geniş vakuollerin ortaya çıktığı belirlenmişti (Resim: 4,5,6,7). Bazı tübül şekillerinin bozulduğu ve lümenlerinde henüz olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücre döküntülerini içerdikleri de izlendi (Resim: 5,7). İnterstisyel alanda ise; Leydig hücrelerinde normal histolojik yapılarında bozulma, ekstraselüler matrikste ve vaskülarizasyonda artış dikkat çekiciydi. Leydig hücrelerinin; poligonal yapılarının farklılaştığı ve sitoplazma kaybı sonucu iğ şeklini aldığı, ayrıca seminifer tübül çaplarının azalmasına bağlı olarak interstisyel alanda genişlemeler gözlemlendi (Resim: 7).

İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney grubuna ait testis dokularında uygulanan PCNA, total-JNK (t-JNK), fosfo-JNK (f-JNK), total-ERK (t-ERK) ve fosfo-ERK (f-ERK) antikorlarının immünreaktivitelerinin değerlendirilmesinde HSCORE değerlerini kullandık. Tüm değerlendirmelerde istatistiksel olarak $P < 0.005$ anlamlı kabul edilerek, Tablo 4'te kontrol ve deney grubuna ait immünreaktivite gösteren değerler özetlenmiştir.

Tablo 4. Kontrol ve diabet gruplarının PCNA, t-JNK, p-JNK, t-ERK ve p-ERK değerlerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=8)	Diabet Grubu (n=12)	P	
PCNA	155±39 150(98-231)	33±11 35(15-54)	<0.001	
t-JNK	99±20 99(67-137)	118±38 120(60-194)	=0.125	<0.001*
f-JNK	194±32 200(150-243)	233±29 234(183-280)	=0.002	=0.170†
t-ERK	175±16 172(145-221)	145±40 141(82-233)	=0.004	<0.001‡
f-ERK	180±53 193(48-242)	95±40 94(25-186)	<0.001	=0.001§

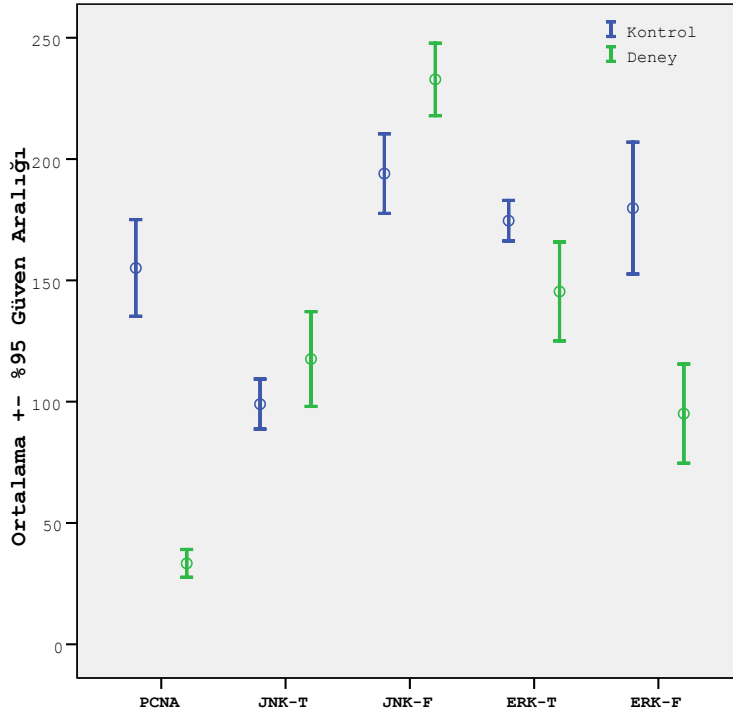
*=Kontrol grubunda t-JNK ve f-JNK karşılaştırıldığında

†= Kontrol grubunda t-ERK ve f-ERK karşılaştırıldığında

‡= Diabet grubunda t-JNK ve f-JNK karşılaştırıldığında

§= Diabet grubunda t-ERK ve f-ERK karşılaştırıldığında

İmmünohistokimyasal reaktivite incelendiğinde; PCNA immünreaktivitesinin diabet grubunda kontrole göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). t-JNK immünreaktivitesinin; kontrol grubuna göre, diabet grubundaki artışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0,125$), f-JNK immünreaktivitesinin ise; kontrol grubuna göre, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Ayrıca, kontrol grubunda t-JNK ve f-JNK immünreaktivitesi arasındaki fark karşılaştırıldığında; f-JNK aktivasyonu, t-JNK'ya göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Diabet grubunda, t-JNK ve f-JNK aktivasyonu karşılaştırıldığında; f-JNK aktivasyonu t-JNK'ya göre anlamlı derecede artmıştı ($p<0,001$). t-ERK immünreaktivitesine bakıldığında ise; kontrol grubuna göre, diabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma ($p=0,004$), gözlenirken, f-ERK için bu azalma $p<0,001$ oranında istatistiksel anlamlılık taşımaktaydı. Ayrıca, kontrol grubunda t-ERK ve f-ERK aktivasyonu karşılaştırıldığında; anlamlı derecede bir fark bulunamadı ($p=0,170$). Diabet grubunda, t-ERK ve f-ERK aktivasyonu karşılaştırıldığında ise; t-ERK'ya göre f-ERK aktivasyonu, anlamlı derecede düşük gözlemlendi ($p=0,001$).



Şekil 3. Kontrol ve diabet gruplarının PCNA, t-JNK, p-JNK, t-ERK ve p-ERK değerlerinin karşılaştırılması

PCNA immünreaktivite bulguları: PCNA immünreaktivitesi, kontrol grubu testis dokusu seminifer tübüllerinde spermatogonyumlarda şiddetli, spermatozoid-I ve spermatozoid-II'lerde orta ve zayıf şiddette reaktif (Resim 8,9). Diabet grubunda ise sadece birkaç seri hücrelerinde orta şiddette, çoğunlukla ise zayıf şiddette immünreaktivite izlendi (Resim: 10,11,12,13).

Diabet grubu HSCORE değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşmüştü ($p < 0,001$). HSCORE değerlerine göre, kontrol grubu seri hücrelerinde; PCNA'ya pozitif reaksiyon veren hücre sayısı, diabet grubuna göre çok daha fazla olduğu gözlenmekteydi (Tablo 4).

t-JNK immünreaktivite bulguları: t-JNK immünreaktivitesi kontrol grubu testisi seminifer tübüllerinde, spermatogonyumlarda orta derecede şiddetli, spermatozoid-I ve II'lerde hafif şiddetli derecede reaktif (Resim: 14,15,16). Diabet grubunda ise spermatogenez seri hücrelerinde çoğunlukla orta ve hafif derecede şiddetliydi (Resim: 17,18,19).

Kontrol ve diabet gruplarının t-JNK HSCORE değerleri arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p = 0,125$; Tablo 4). Kontrol ve diabet grubuna ait deneklerin negatif kontrollerinde ise hiçbir reaktivite gözlenmedi.

f-JNK immünreaktivite bulguları: f-JNK immünreaktivitesi kontrol grubu testis seminifer tübüllerinde; birçok spermatogonyumda ve spermatozoid-I'lerde şiddetli ve çoğunda orta derecede şiddetli immünreaktif (Resim: 20,21,22). Diabet grubunda, spermatogonyum hücrelerinde şiddetli, spermatozoid-I'lerin bir kısmında yoğun, bir kısmında orta derecede immünreaktivite izlendi (Resim: 23,24,25)

Diabet grubunun HSCORE değerleri, kontrol grubu HSCORE değerlerinden daha yüksekti ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p = 0,002$; Tablo 4). Kontrol ve diabet grubuna ait deneklerin negatif kontrollerinde ise hiçbir reaktivite gözlenmedi.

t-ERK immünreaktivite bulguları: t-ERK immünreaktivitesinin hem sitoplazmik hem de nükleer olarak değerlendirildiği kontrol grubu testisi seminifer tübüllerinde; spermatogonyumlar, spermatozoid-I'ler ve Sertoli hücrelerinde orta şiddette, sperm ve spermatidlerde ise şiddetli derecede reaktif. Sitoplazmaya bakıldığında ise orta şiddette reaktivite gözlemlendi (Resim: 26,27,28).

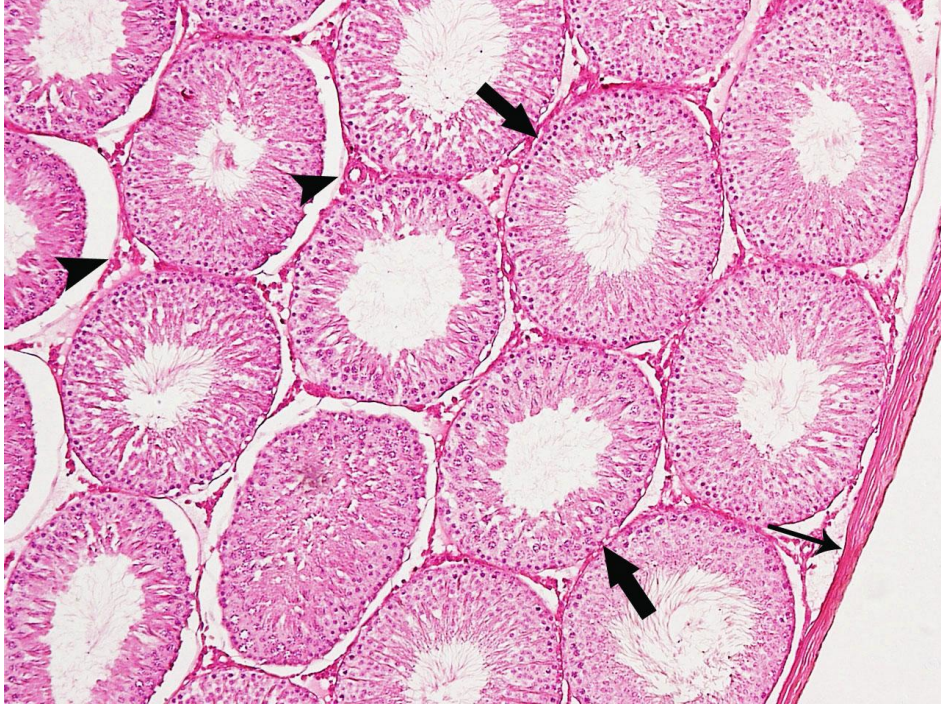
Çoğunlukla sitoplazmik immünreaktivitenin değerlendirildiği deney grubunda; nükleus bazında sadece birkaç spermatogonyumda hafif derecede, geri kalan kısmında ise hiç reaktivite gözlenmedi. Sitoplazmik immünreaktivite, daha şiddetli derecedeydi (Resim: 30,31,32).

Kontrol gruplarının HSCORE değerleri, diabet grubu HSCORE değerlerinden daha yüksekti ve aralarındaki farklar da istatistiksel olarak anlamlılık taşımaktaydı ($p=0.004$; Tablo 4). Kontrol ve diabet grubuna ait deneklerin negatif kontrol testis kesitlerinde; hiçbir reaktivite gözlenmedi.

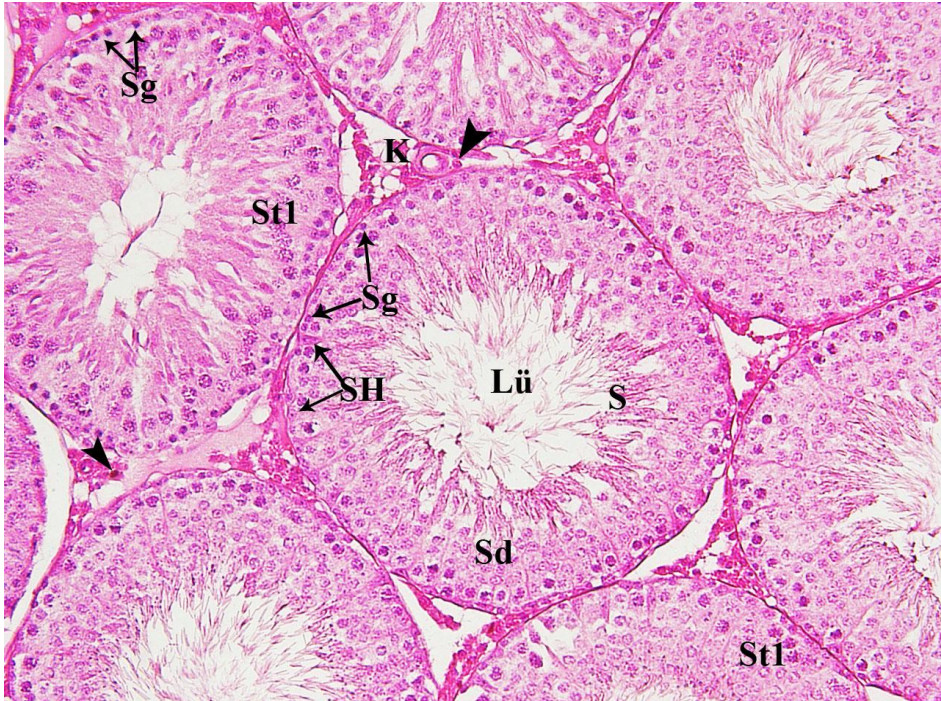
f-ERK immünreaktivite bulguları: f-ERK immünreaktivitesi kontrol grubu testisi seminifer tübüllerinde, spermatogonyumlarda, spermatozoidler, spermiler ve sitoplazmada orta derecede şiddetliydi (Resim: 32,33,34).

Diabet grubunda ise bazı tübüllerde orta derecede reaktivite gözlenirken, bazılarında hiç immünreaktivite gözlenmedi (Resim: 35,36). Reaktivite gözlenen tübüllerde birkaç spermatogonyum hücresinde şiddetli derecede, birkaçında hafif derecede reaktivite gözlenirken (Resim: 36); spermatozoidlerinde sadece birkaç tanesinde hafif şiddette reaktivite, geri kalan kısmında ise hiç immünreaktivite gözlenmedi (Resim: 37). Sitoplazmada ise yer yer orta derecede, bazı kısımlarda hiç immünreaktivite gözlenmedi (Resim: 35,36,37).

Kontrol gruplarının HSCORE değerleri, diabet grubu HSCORE değerlerinden daha yüksekti ve aralarındaki fark ta istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$; Tablo 4). Kontrol ve diabet grubuna ait deneklerin testis kesitlerinde, negatif kontrolde hiç reaktivite gözlenmemiştir.



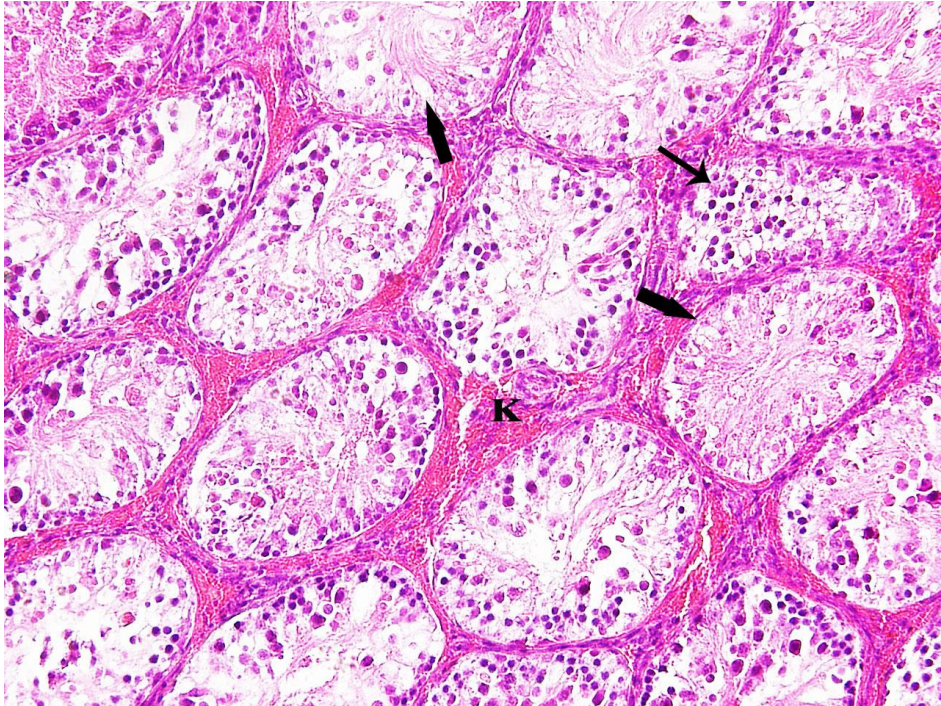
Resim 1. Kontrol grubu testisinde, çapları birbirine yakın normal yapıda ve spermatogenezin farklı aşamalarının izlendiği, normal kalınlıkta bazal laminaya sahip seminifer tübüller (→) ile aralarındaki interstisyel bağ doku (▶) ve normal kalınlıktaki tunika albuginea (→) gözlenmektedir. H+E, X100.



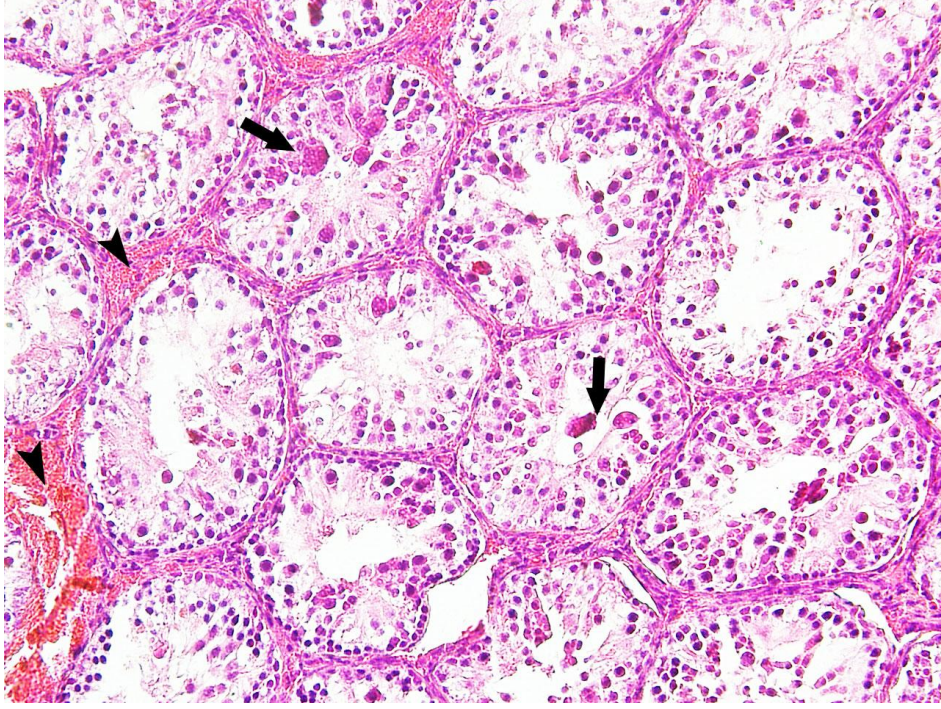
Resim 2. Kontrol grubuna ait düzenli sınırlara sahip seminifer tübüllerde, düzenli dizilim gösteren germ hücrelerinin bazaldan lümene (Lü) doğru; spermatogonyum (Sg), spermatosit-I'ler (St1), lümene yakın spermatidler (Sd) ve spermler (S) şeklinde sıralandığı, Sertoli hücrelerinin (SH) ise tübülün hemen bazal laminası üzerinde yerleştiği gözlenmektedir. İnterstisyel sahada kan kapillerleri (K) etrafında yerleşmiş olan poligonol şekilli Leydig hücrelerinin (▶) oval biçimli nükleusu ve eozinofilik boyanmış sitoplazması izlenmektedir. H+E, X200.



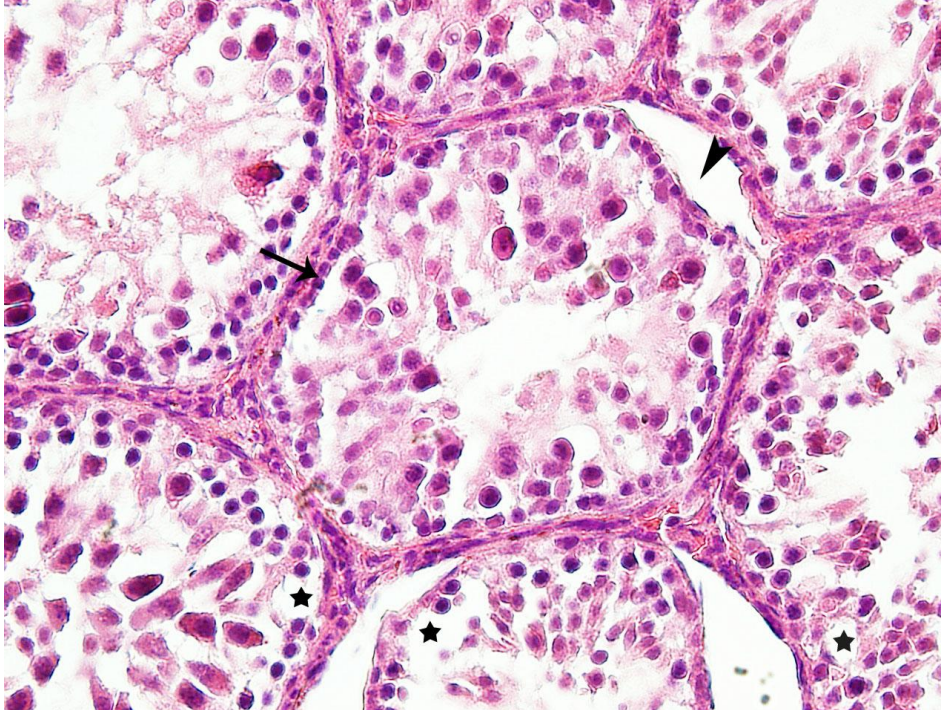
Resim 3. Diabet grubuna ait sıçan testis dokusunda, germinal epitel hücrelerinin birbirlerinden ve tübül bazal laminadan ayrılarak dökülmeleri sonucunda epitel içerisinde boşluklar (*), kopmalar ve dev hücrelerin ortaya çıktığı gözlenmektedir. Atrofik seminifer tübüller (→) ve aralarında yoğunlaşmış interstisyel alan (▶) gözlenmektedir. H+E, X100.



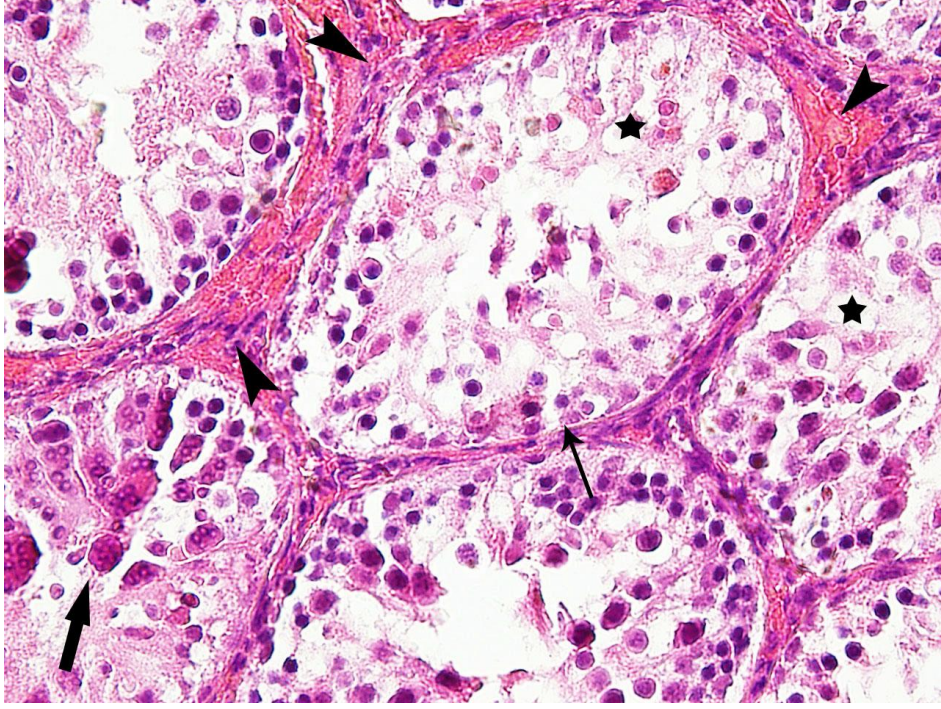
Resim 4. Diabet grubu seminifer tübüllerinde rastlanan bulgular, diabetin oluştuğunu gösterir şekildedir. Tübüllerdeki germ hücre organizasyonunun bozulduğu (→), bazı tübüllerde germ hücre tükenmesinin çok fazla olduğu (←) ve interstisyel alanda vaskülarizasyon artışı (K) dikkati çekmektedir. H+E, X200.



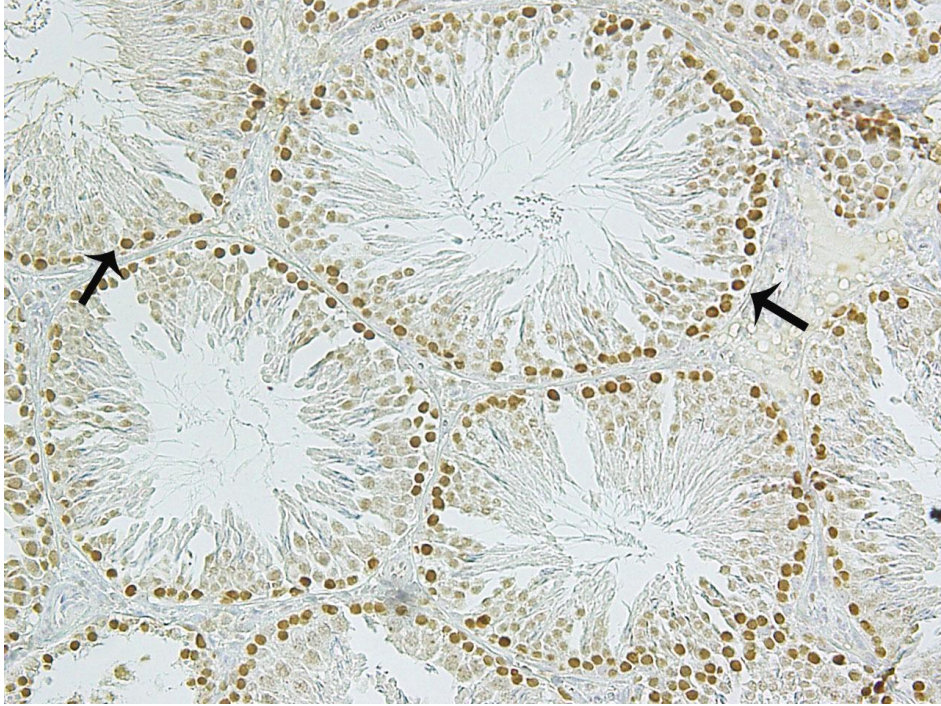
Resim 5. Diabet grubu seminifer tübüllerinde, germ hücre diziliminin bozulduğu gözlenmektedir. Bazı tübüllerde çok nükleuslu dev hücreler (→) ve ayrıca intertübüler hyalinizasyon (▶) dikkati çekmektedir. H+E, X200.



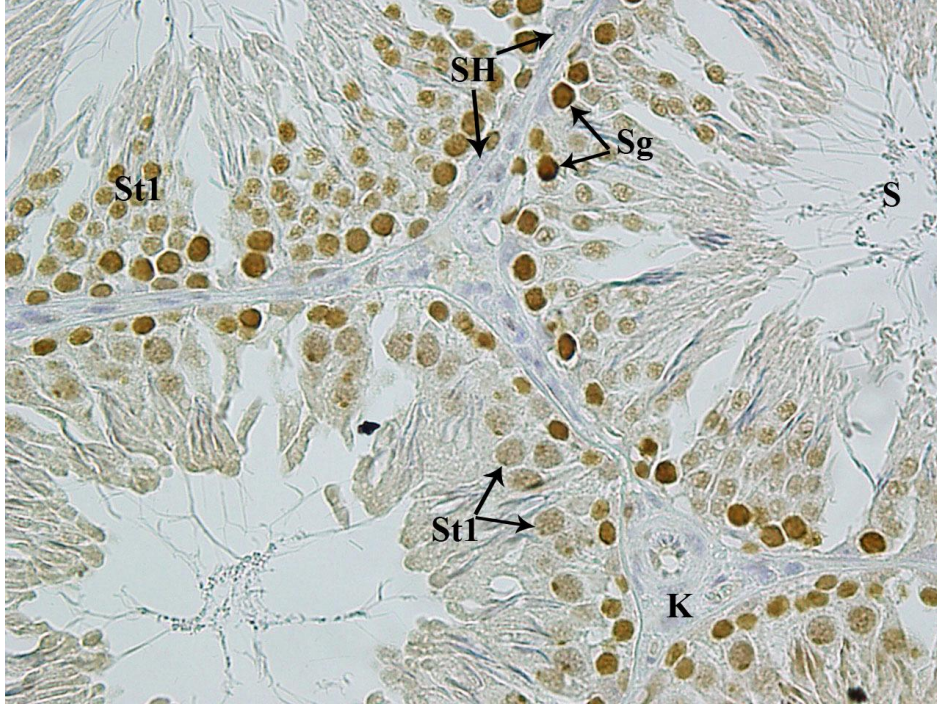
Resim 6. Diabet grubunda tübül hasarına (→) bağlı olarak spermatogenik seri hücre bağlantılarının bozulması sebebiyle vakuolleşmeler (*) ve interstisyel alandan ayrılmalar (▶) gözlenmektedir. H+E, X400.



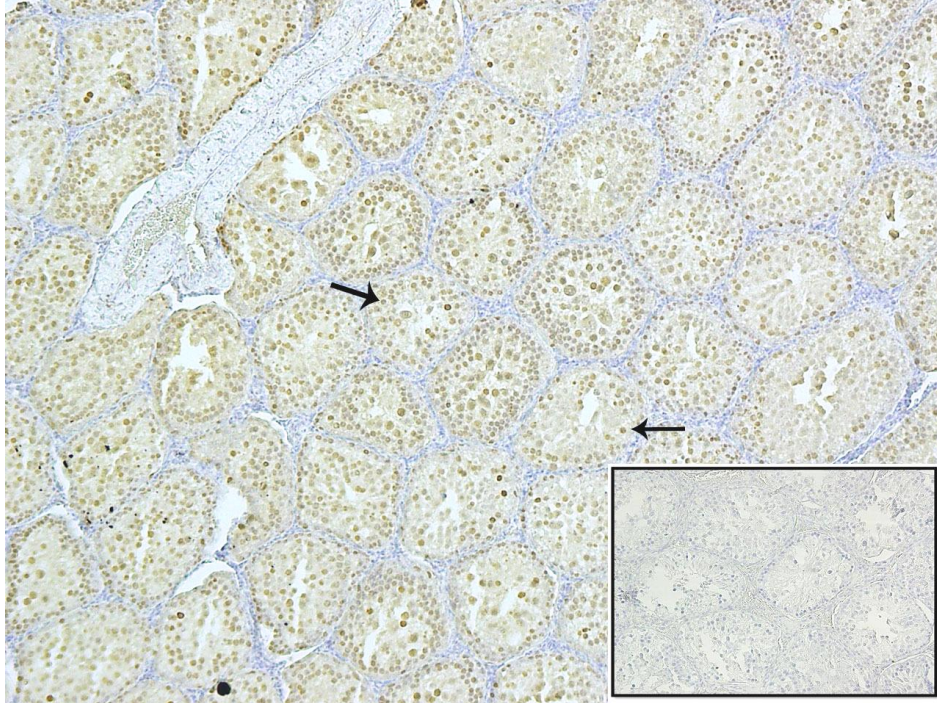
Resim 7. Spermatogenik seri hücre diziliminin ciddi derecede hasar gördüğü seminifer tübüllerde (→) bu duruma tepki olarak interstisyel alanda ve vaskülarizasyonda artış (▶) gözlenmektedir. Ayrıca tübül duvarında vakuolizasyon (*) ve çok nükleuslu dev hücrelerin (⇒) varlığı gözlenmektedir. H+E, X400.



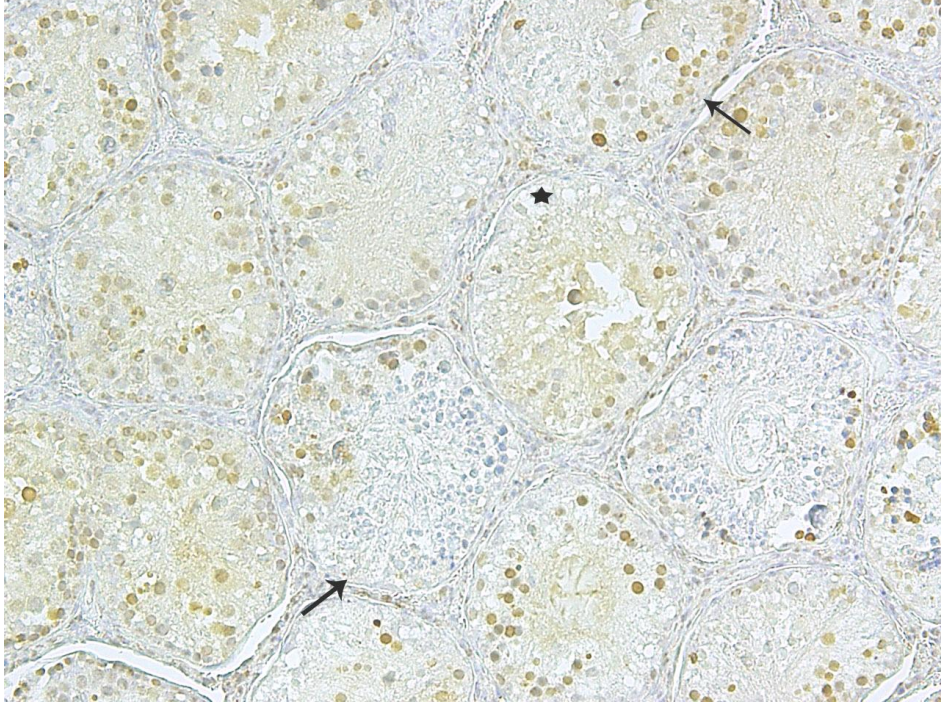
Resim 8. Kontrol grubu testisinde, çapları birbirine yakın normal yapıda ve spermatogenezin farklı aşamasında olan, normal kalınlıkta bazal laminaya sahip seminifer tübüllerde (→) PCNA immünreaktivitesi pozitif olduğu görülmektedir. PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X200.



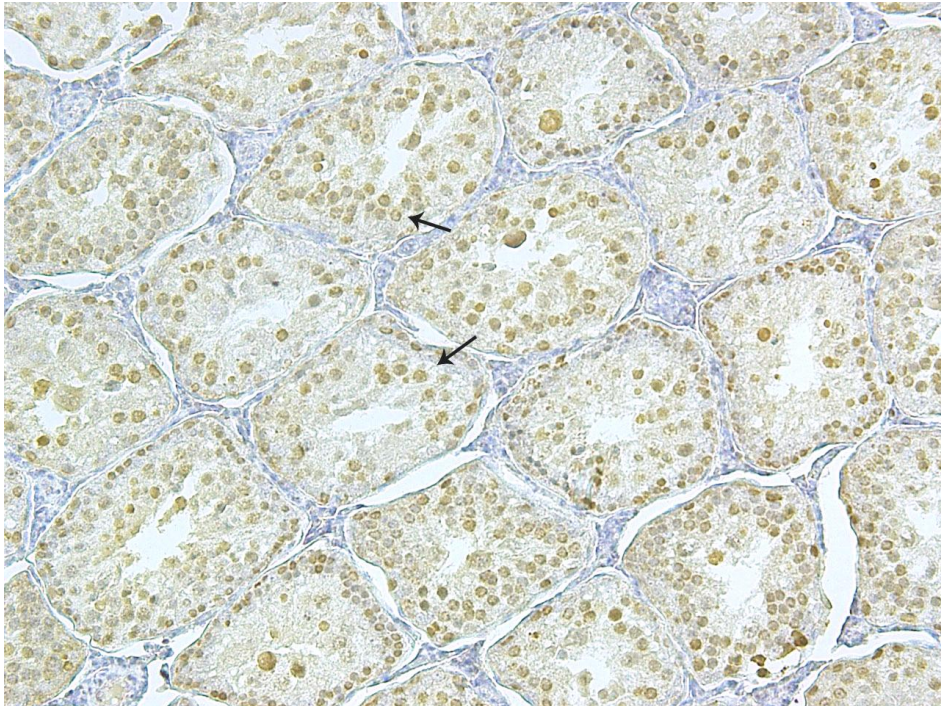
Resim 9. Kontrol grubuna ait seminifer tübül epitelinde hücrelerin, şiddetli immünreaktivite gösteren spermatogonyumlar (Sg), orta ve zayıf immünreaktivite izlenen spermatosit-I (St1), spermatid, sperm (S) şeklinde sıralandığı, Sertoli hücrelerinin (SH) ise immünreaktivite göstermediği gözlenmektedir. PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X400.



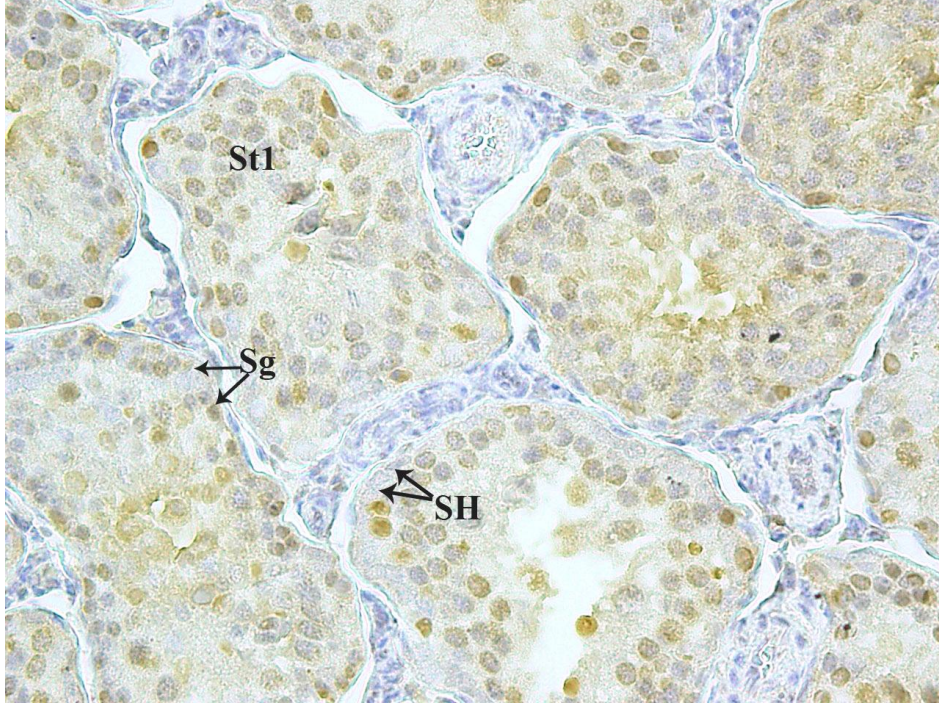
Resim 10. Diabet grubu seminifer tübüllerde (→), PCNA immünreaktivitesinin hücre nükleuslarında pozitif olduğu gözlenmektedir. Hematoksilin zıt boyaması, X100. İçsel dikdörtgen, negatif kontrol, X200.



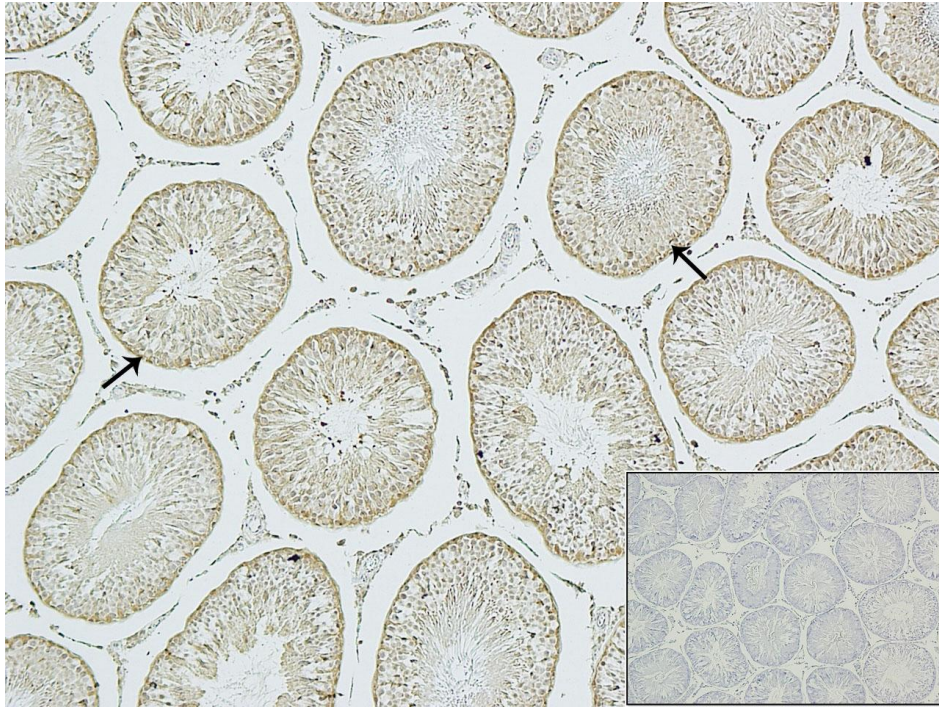
Resim 11. Diabet grubunda, oldukça zayıf immünreaktivite (→) ve germ epitelinde vakuolizasyon (*) gözlenmektedir. PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X200.



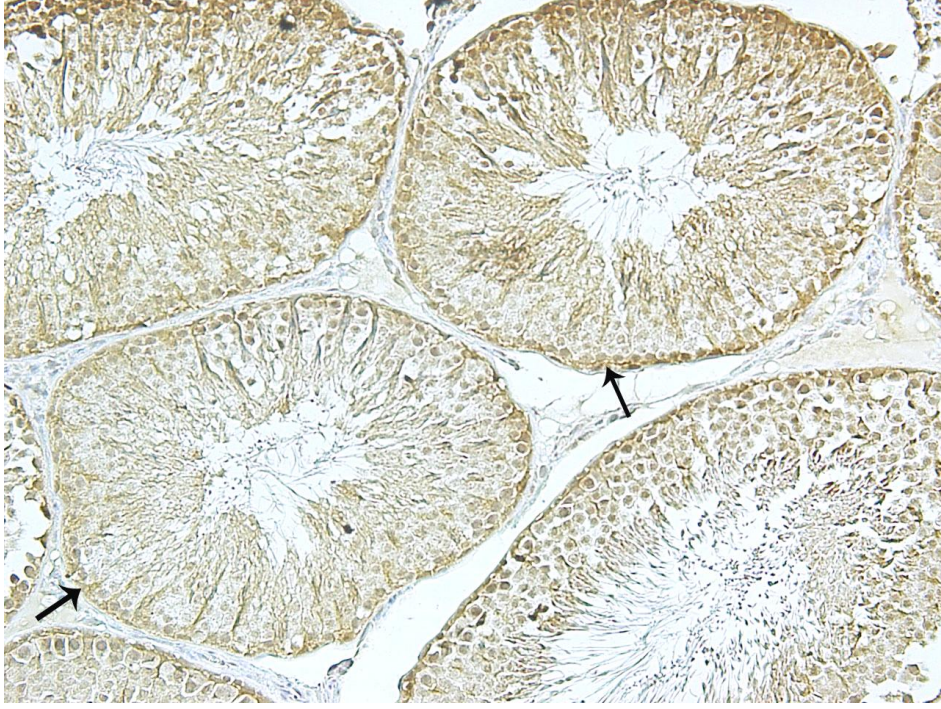
Resim 12. Seminifer tübüllerde bazı germ hücrelerinde orta derecede şiddetli immünreaktivite (→) gözlenmektedir. PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X200.



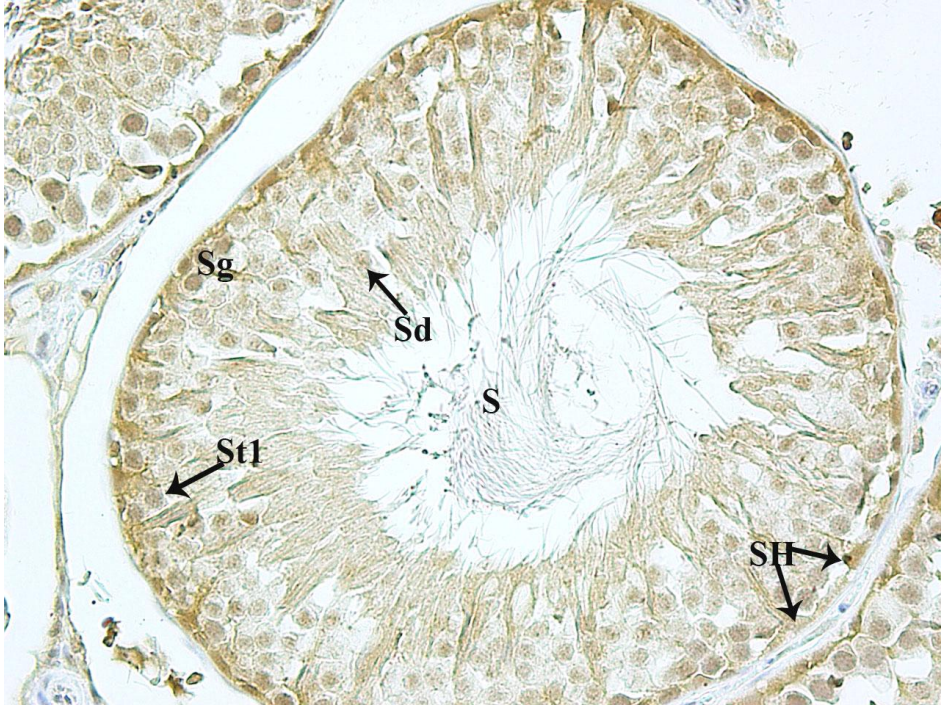
Resim 13. Hafif derecede şiddetli immunreaktivite izlenen spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I (St1)'ler ve immünreaktivite göstermeyen Sertoli hücreleri (SH) gözlenmektedir. PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X400.



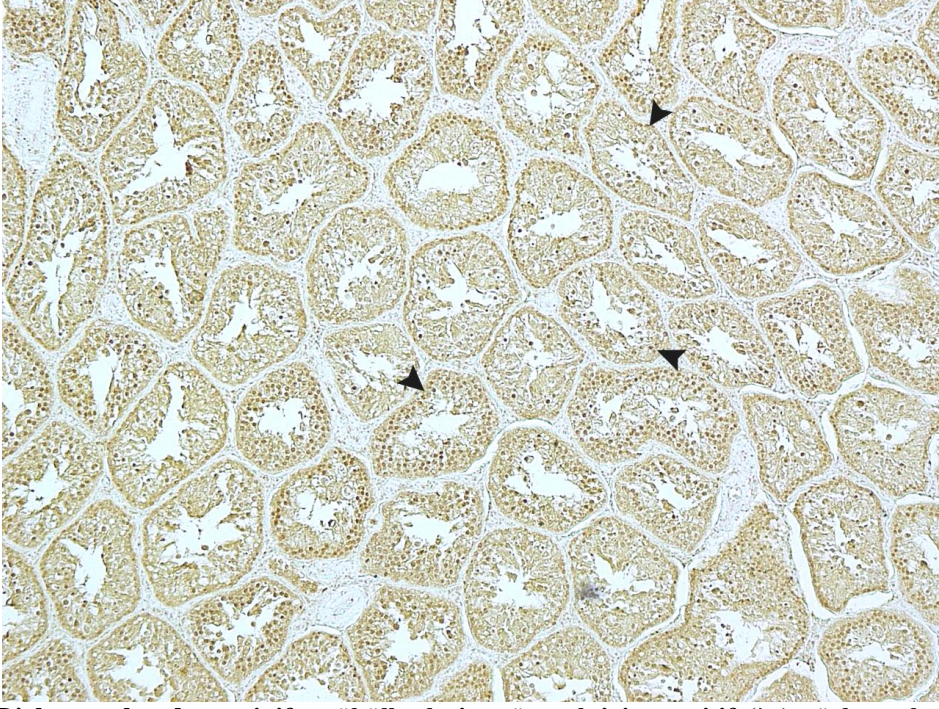
Resim 14. Birbirine yakın normal yapıda ve spermatogenezin farklı aşamasında olan normal kalınlıkta bazal laminaya sahip seminifer tübüllerde (→) t-JNK immünreaktivitesi pozitif gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X100. İçsel dikdörtgen; negatif kontrol, X100.



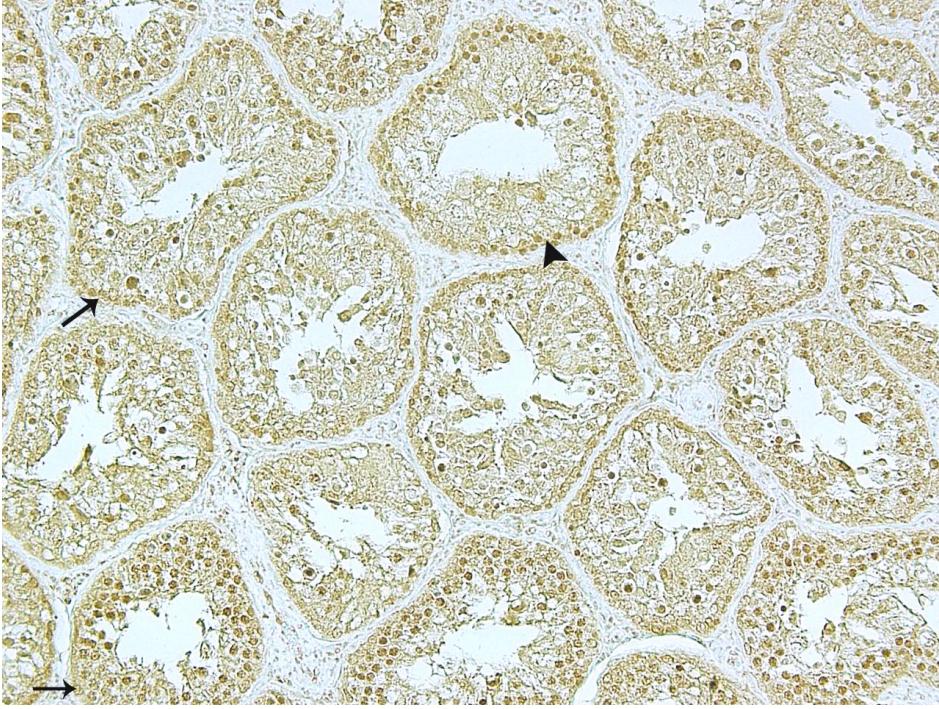
Resim 15. Seminifer tübüllerde (→) orta derecede immünreaktivite gözlenmektedir. t-JNK, hematoksilen zıt boyaması X200.



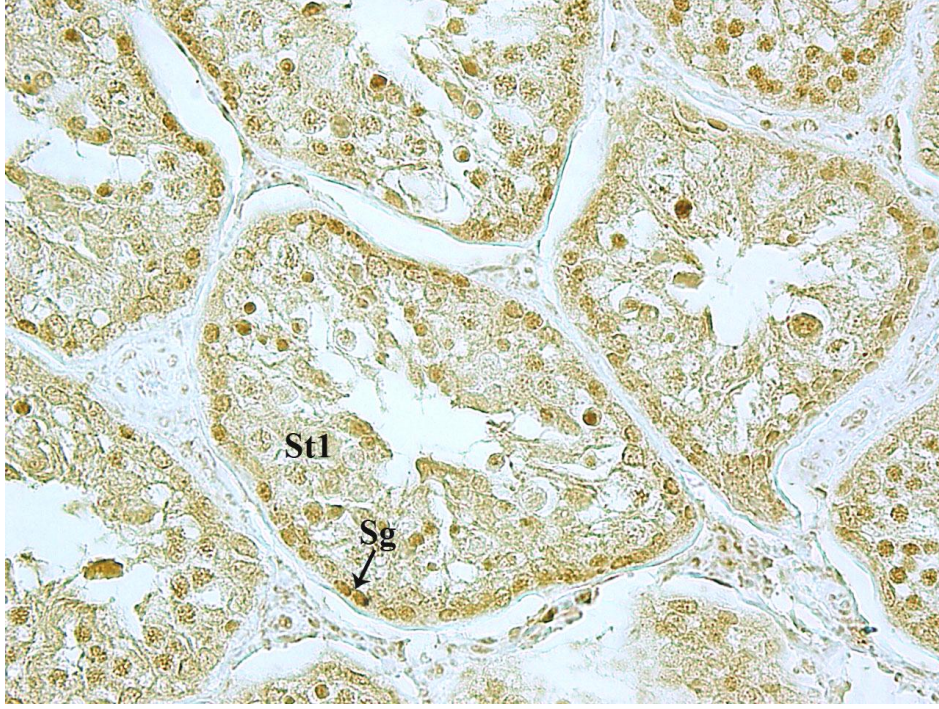
Resim 16. Kontrol grubuna ait germ hücrelerinde orta derecede şiddetli reaktivite gösteren spermatogonyumlar (Sg), hafif derecede immünreaktivite gösteren spermatosit-I (St1), spermatid (Sd), sperm (S) şeklinde sıralandığı ve Sertoli hücrelerinin (SH) hafif immünreaktivite gösterdiği gözlenmektedir. t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.



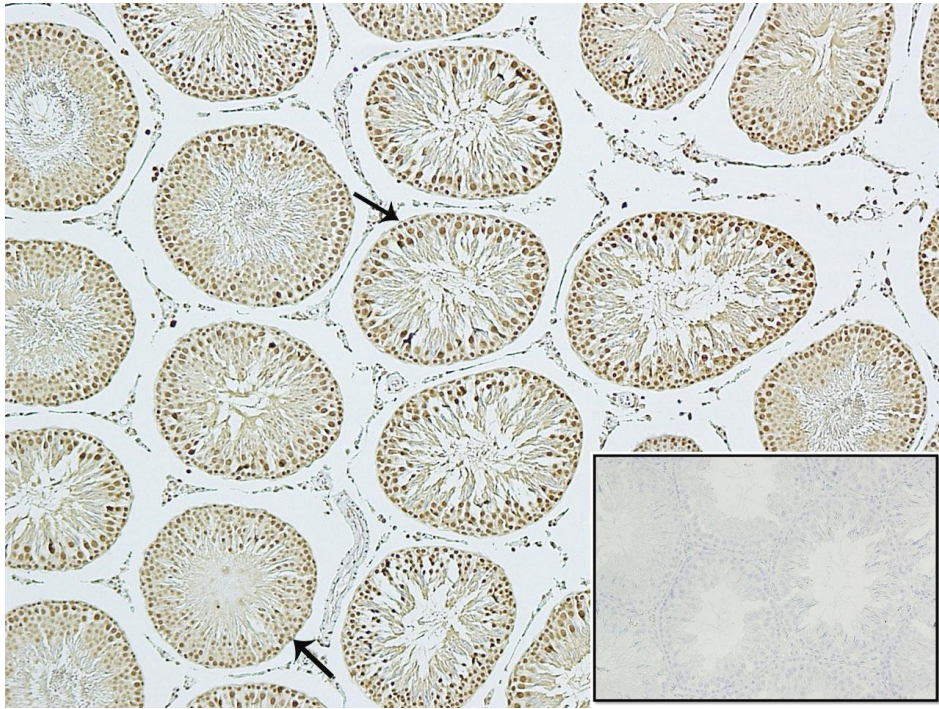
Resim 17. Diabet grubunda seminifer tübüllerde immünreaktivite pozitif (►) gözlenmektedir. t-JNK, hematoksilin zıt boyaması, X100.



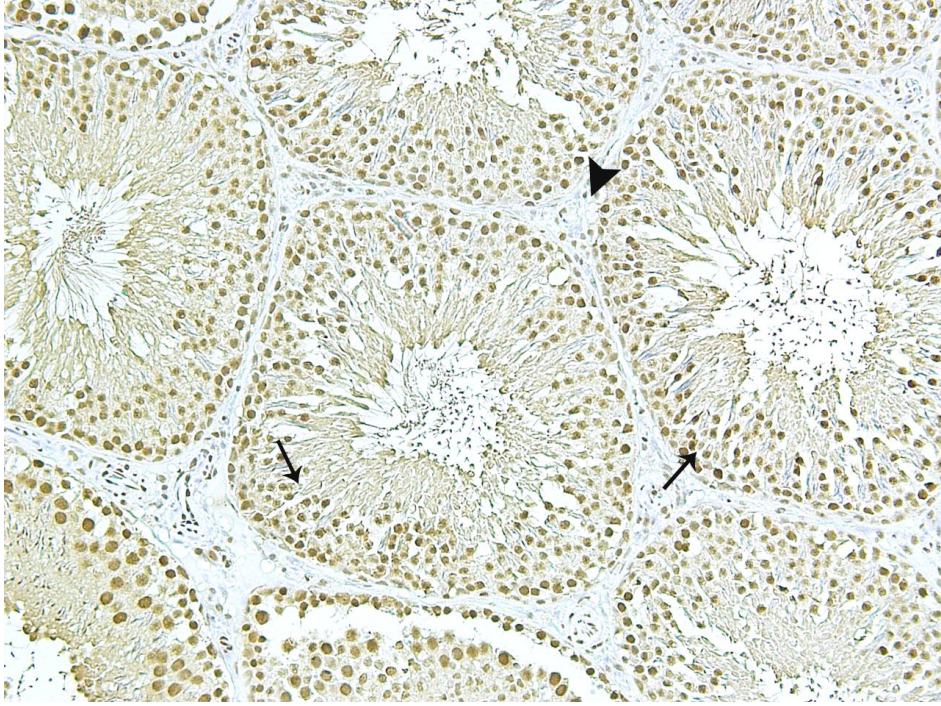
Resim 18. Spermatogenik seri hücrelerinin çoğunda orta (►) ve hafif (→) derecede şiddetli immünreaktivite gözlenmektedir. t-JNK, hematoksilin zıt boyaması, X200.



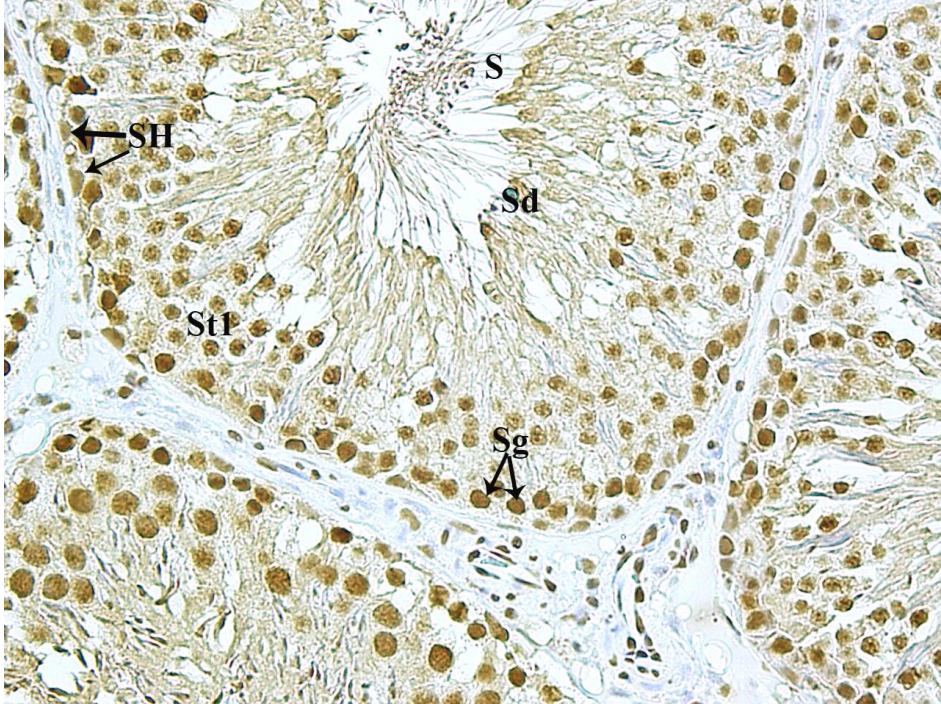
Resim 19. Diabet grubunda spermatogenik seri hücre dizilimi bozulan seminifer tübüllerde, orta derecede immünreaktivite gösteren spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1) gözlenmektedir. t-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X400.



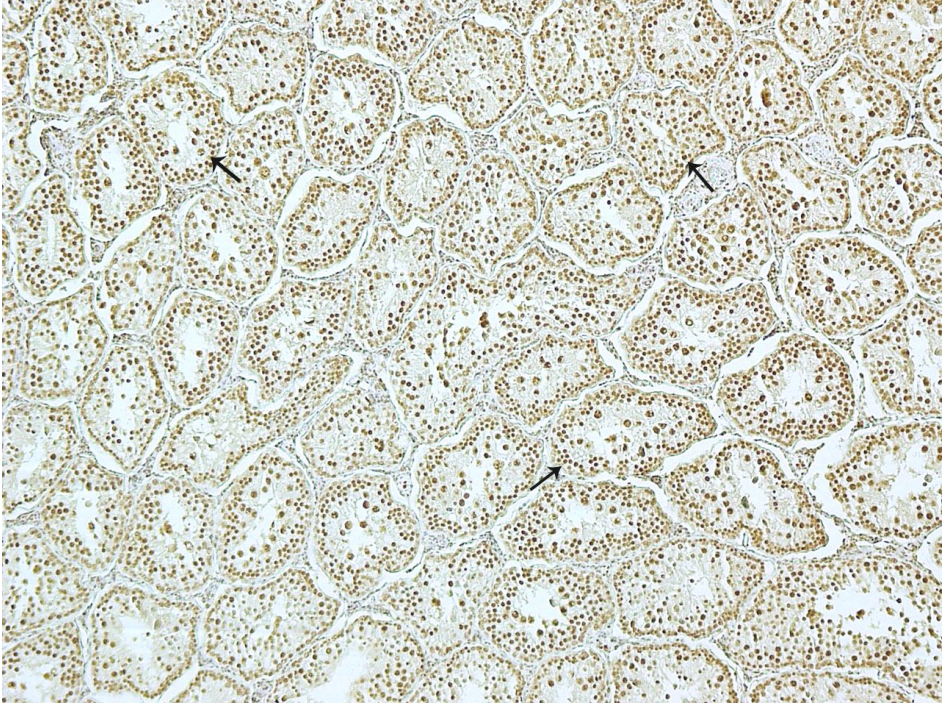
Resim 20. Kontrol grubu testis dokusunda; çapları birbirine yakın, normal yapıda ve spermatogenezin farklı aşamasında olan, normal kalınlıkta bazal laminaya sahip seminifer tübüllerde (→) immünreaktivitenin pozitif olduğu gözlenmektedir. f-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X200. İçsel dikkörtgen, negatif kontrol, X200.



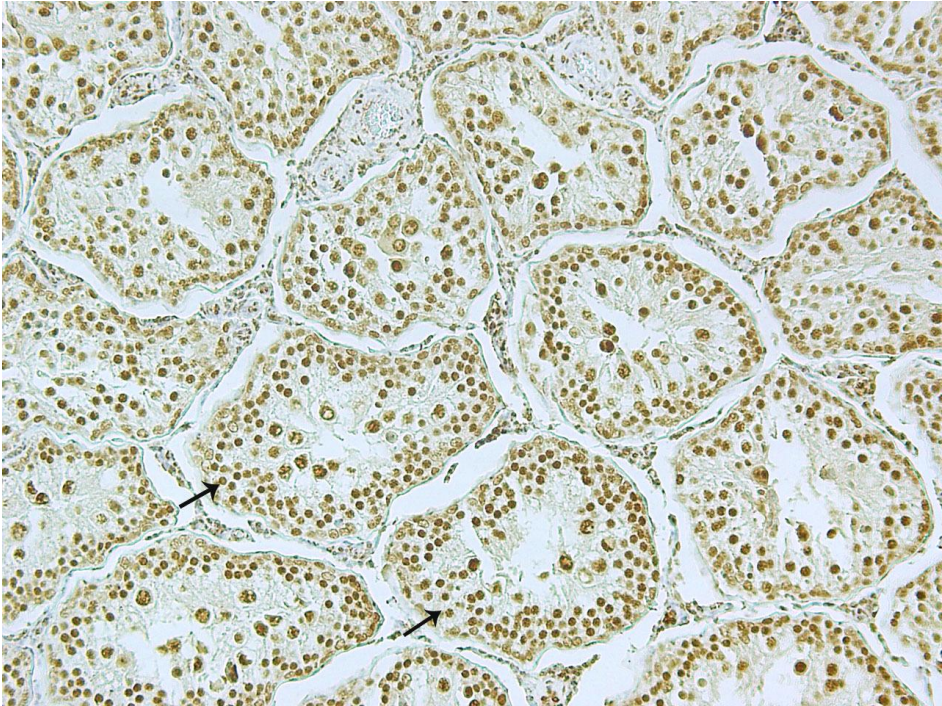
Resim 21. Kontrol grubunda düzenli dizilim gösteren seminifer tübüllerde, (→) şiddetli derecede immünreaktivite gözlenmektedir. İnterstisyel alan (►) normal histolojik yapı göstermektedir. f-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X200.



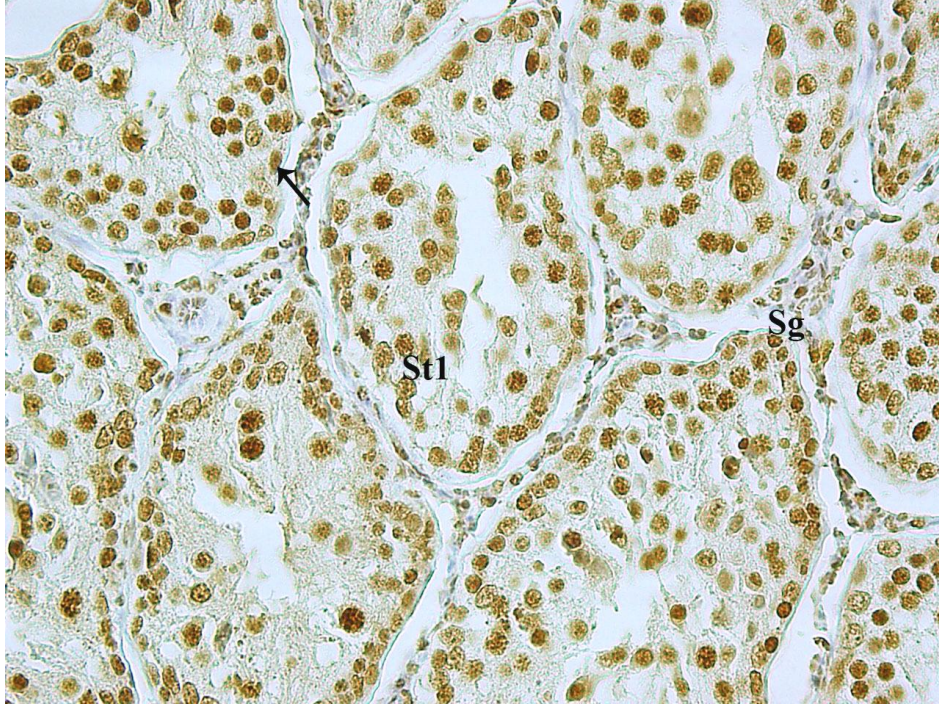
Resim 22. Kontrol grubunda şiddetli derecede immünreaktivite gösteren spermatogonyum (Sg), orta derecede immünreaktivite gösteren spermatosit-I (St1), spermatid (Sd), sperm (S) şeklinde sıralandığı ve Sertoli hücrelerinin (SH) de orta derecede immünreaktivite gösterdiği gözlenmektedir. f-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X400.



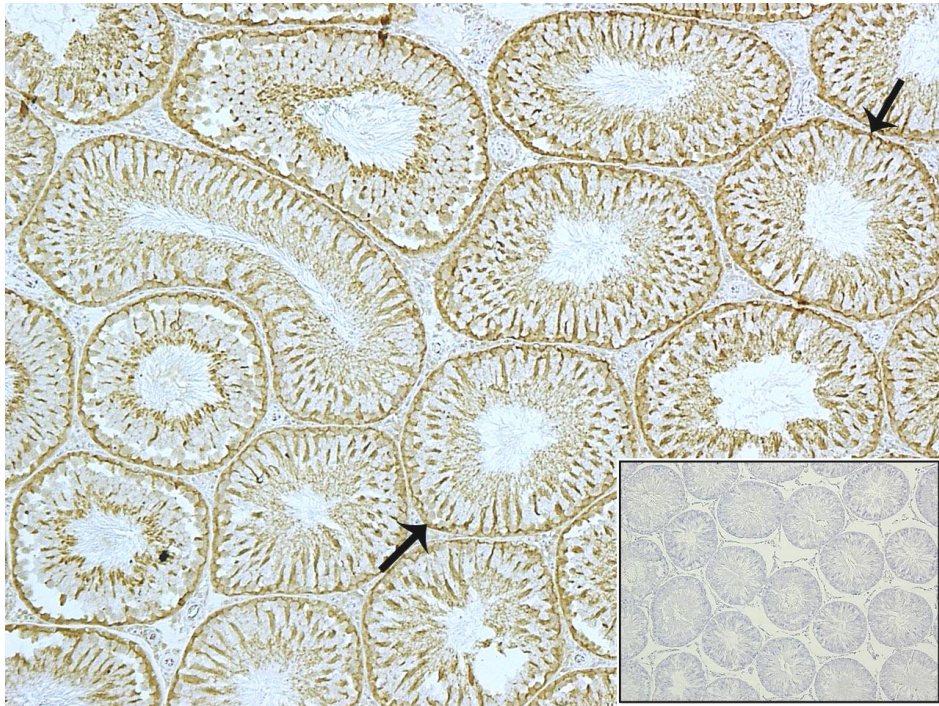
Resim 23. Diabet grubunda seminifer tübüllerde (→) immünreaktivite pozitif gözlenmektedir. f-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X100.



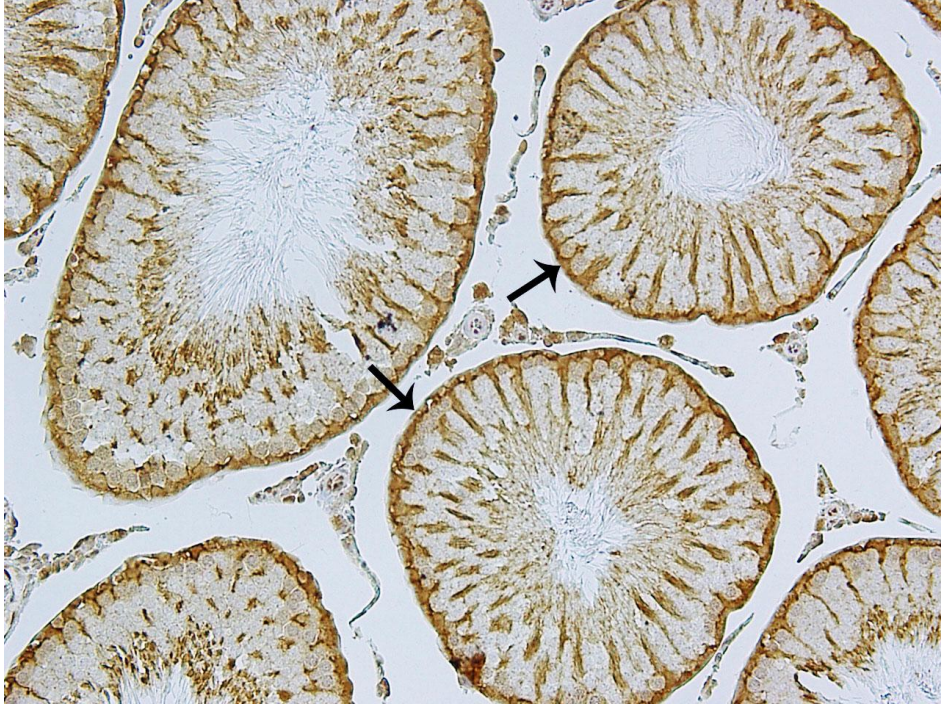
Resim 24. Seminifer tübüllerde (→) çoğunlukla şiddetli derecede immünreaktivite gözlenmektedir. f-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X200.



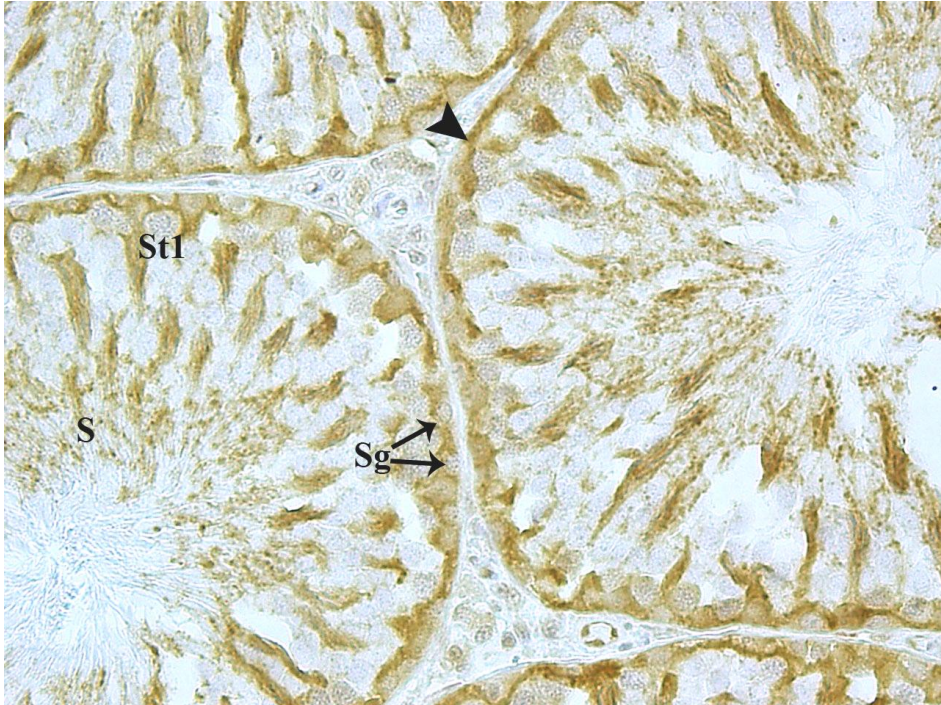
Resim 25. Spermatogonyumların (Sg), ve spermatosit-I'lerin (St1) bir kısmında yoğun, bir kısmında ise orta derecede şiddetli immünreaktivite, Sertoli hücrelerinde orta şiddetli immünreaktivite (→) görülmektedir. f-JNK, hematoxilen zıt boyaması, X400.



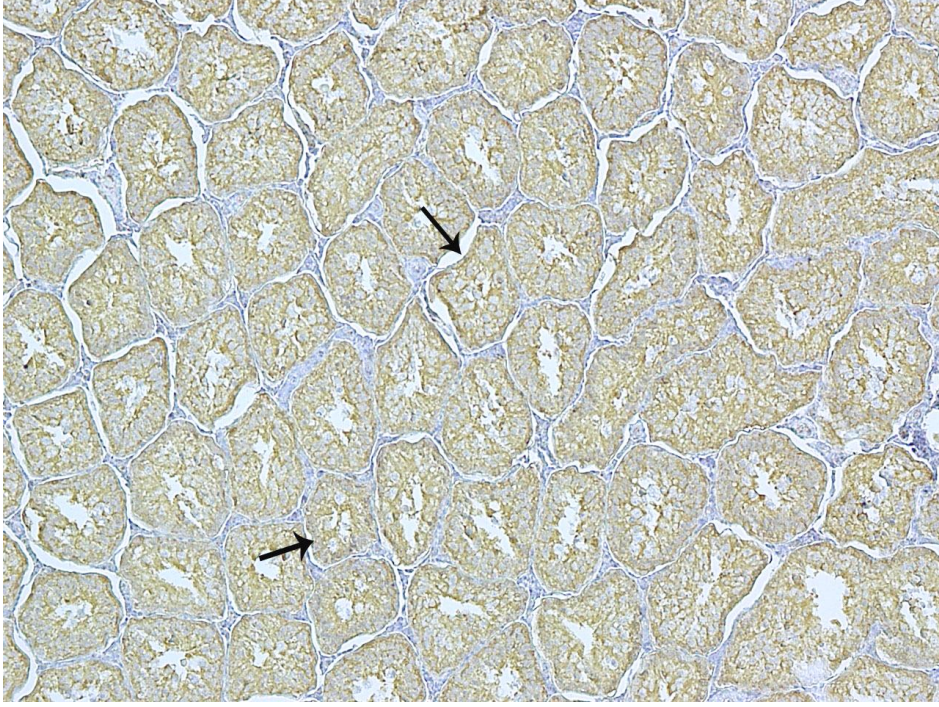
Resim 26. Kontrol grubu testisinde, seminifer tübüllerinde (→) hem nükleus hemde sitoplazma immünreaktivitesi pozitif gözlenmektedir. t-ERK, hematoxilen zıt boyaması, X100.



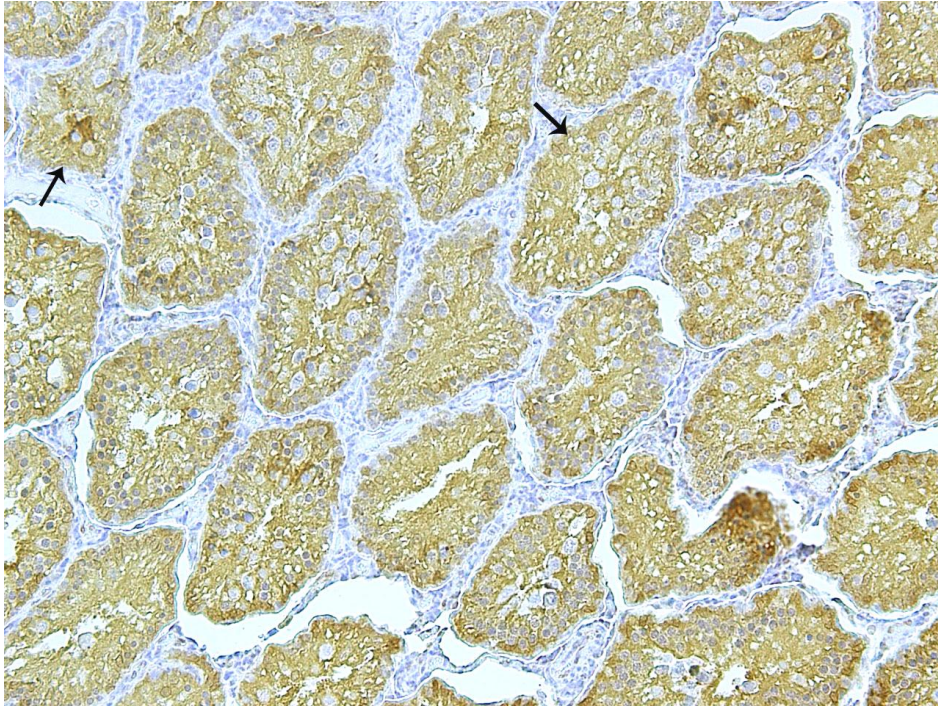
Resim 27. Kontrol grubu seminifer tübüllerde (→) bazı tübüllerde şiddetli, bazılarında ise orta derecede şiddetli immünreaktivite görülmektedir. t-ERK, hematoksilin zıt boyaması, X200.



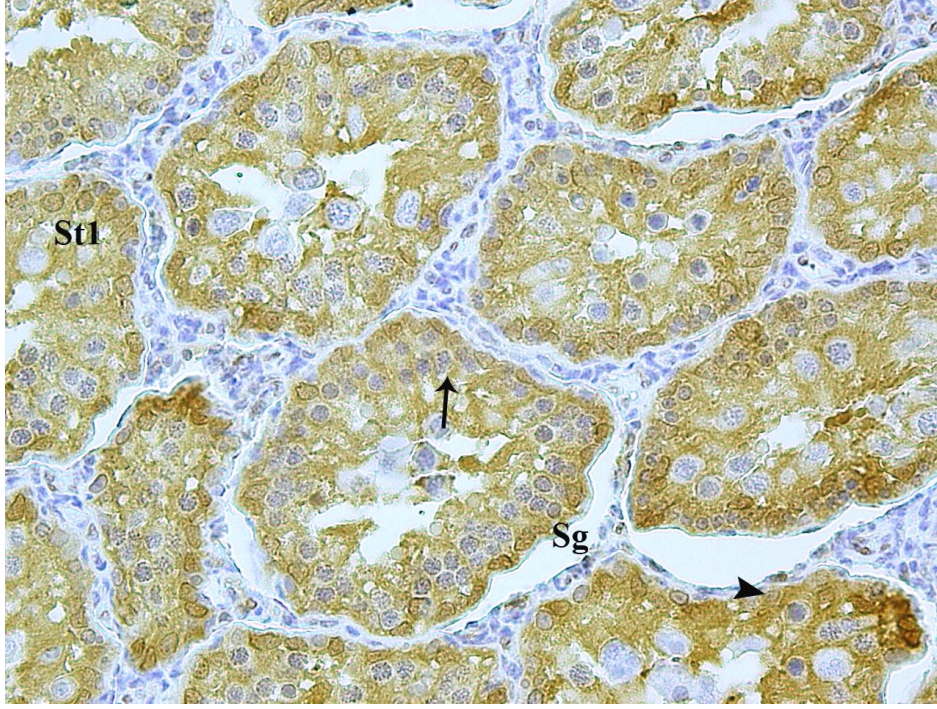
Resim 28. Seminifer tübüllerdeki (►) seri hücrelerinin daha çok sitoplazmik olarak orta derecede immünreaktivite gösteren, spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I (St1), spermiler (S) şeklinde sıralandığı gözlemlendi. t-ERK, hematoksilin zıt boyaması, X400.



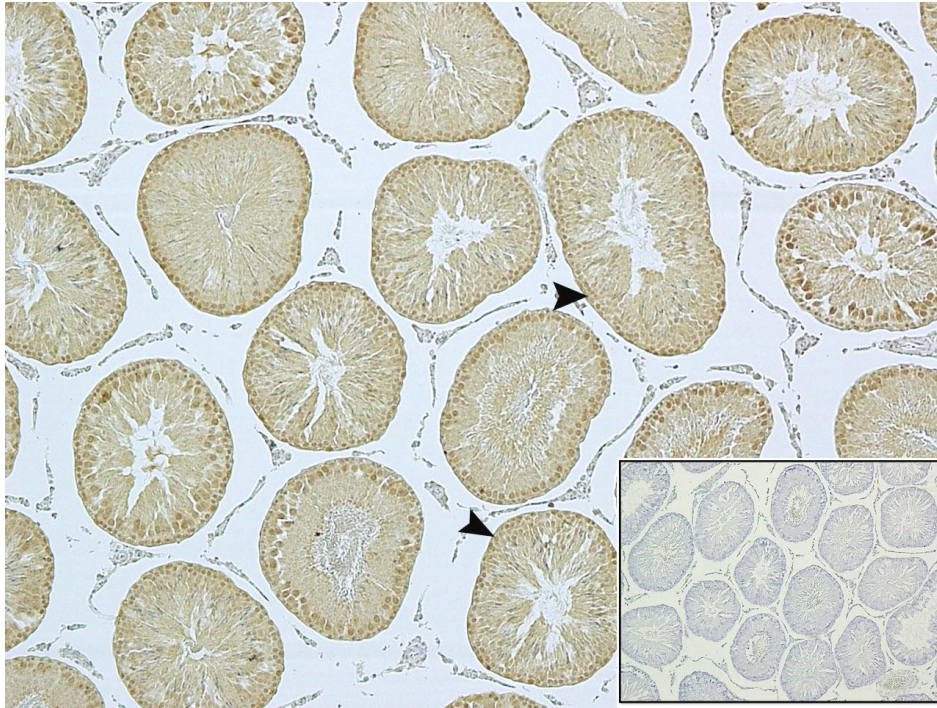
Resim 29. Diabet grubu seminifer tübüllerinde (→), çoğunlukla sitoplazmik t-ERK pozitif immünreaktivite görülmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



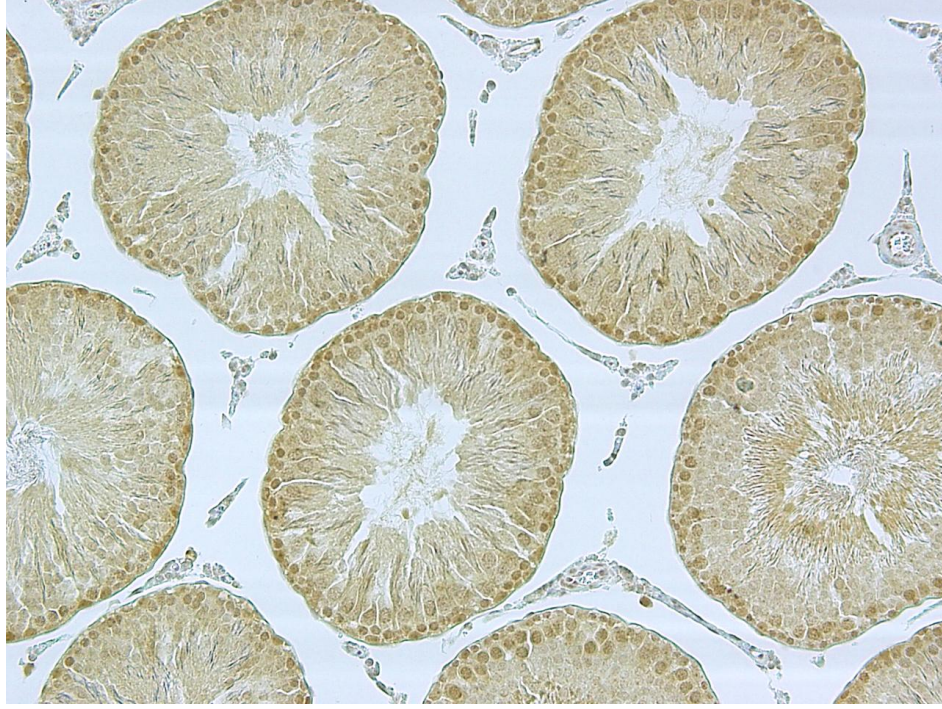
Resim 30. Diabet grubu seminifer tübüllerinde (→), orta şiddette sitoplazmik t-ERK immünreaktivitesi izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.



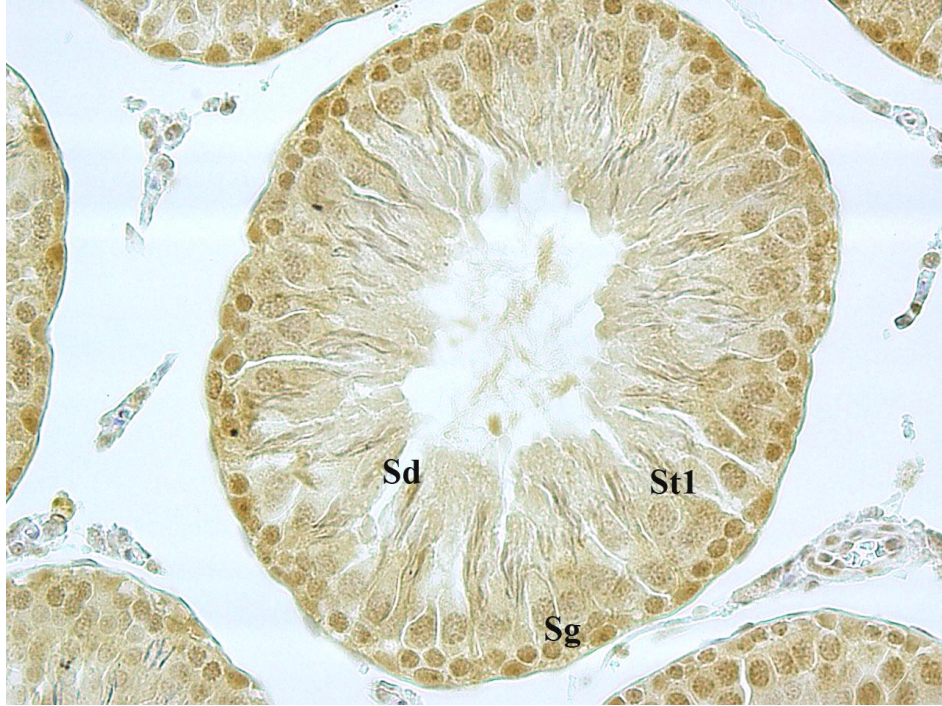
Resim 31. Diabet grubunda nükleus bazında sadece birkaç spermatogonyum (Sg) ve Spermatozit 1 (St1) hücresinde hafif derecede, geri kalan kısmında ise hiç reaktivite (→) gözlenmemiştir. Sertoli hücreleri sitoplazmasında ise orta derecede şiddetli reaktif (►) görülmektedir. t-ERK, hematoxilen zıt boyaması, X400.



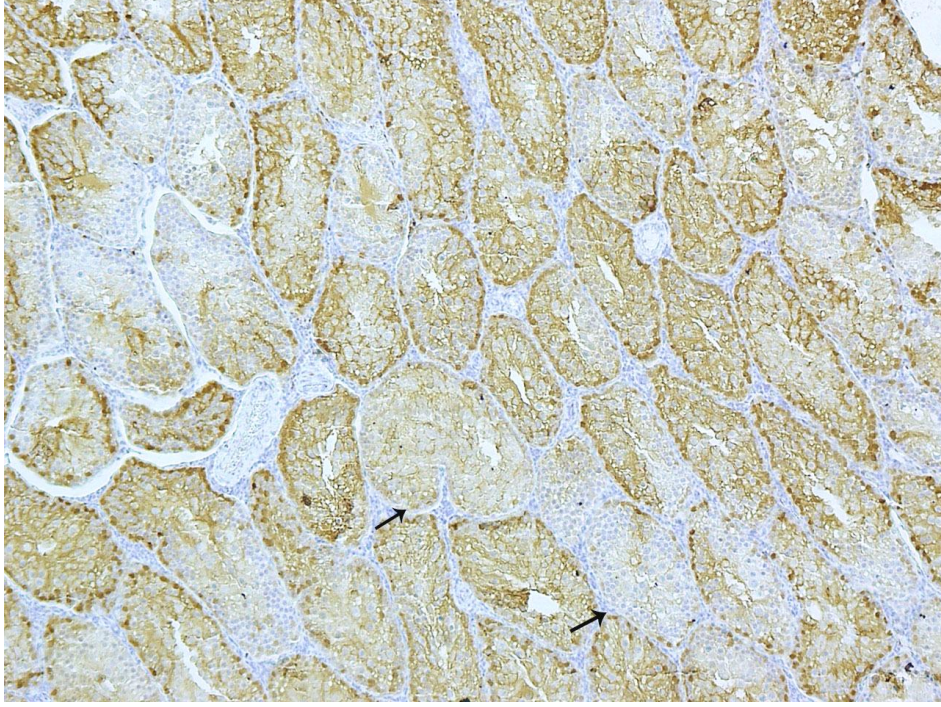
Resim 32. Kontrol grubu testisinde, çapları birbirine yakın normal yapıda ve normal kalınlıkta bazal laminaya sahip seminifer tübüller (►) immünreaktivite pozitif gözlenmektedir. f-ERK, hematoxilen zıt boyaması, X100.



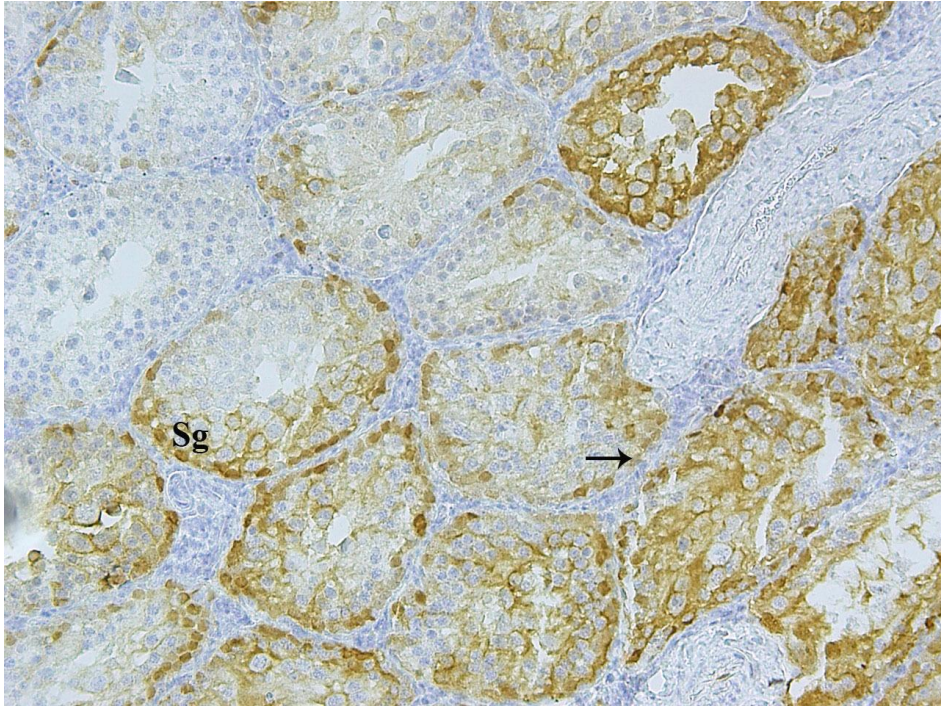
Resim 33. Kontrol grubundaki spermatogenezin farklı aşamasında olan seminifer tübüllerde orta derecede şiddetli immünreaktivite görülmektedir. f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X200.



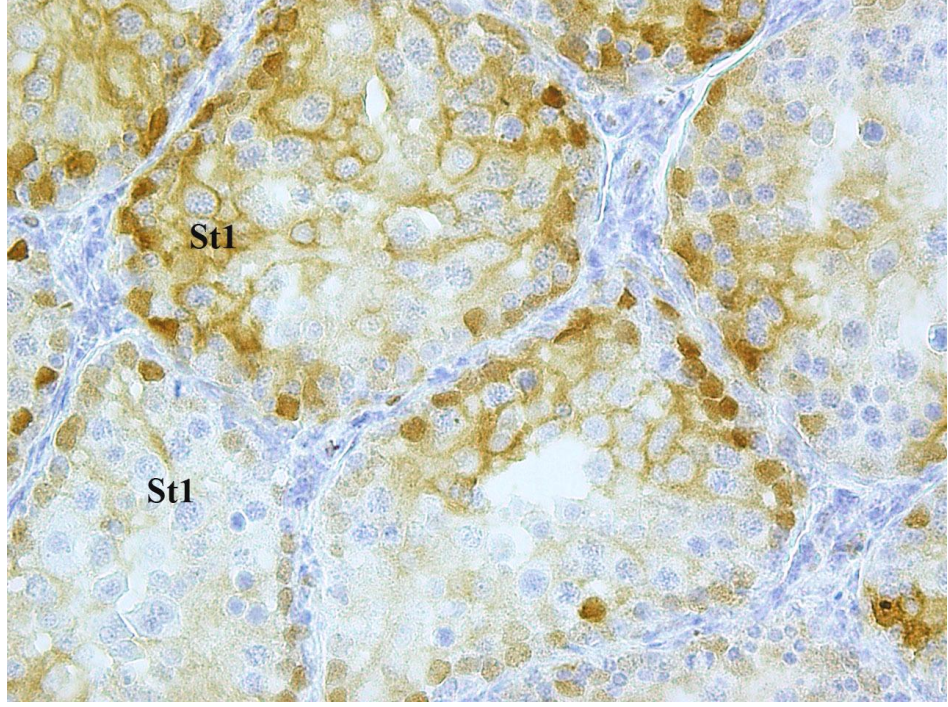
Resim 34. Kontrol grubunda orta şiddetli derecede immünreaktivite gösteren, spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I (St1), spermatid (Sd)'ler izlenmektedir. f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X400.



Resim 35. Diabet grubu seminifer tübüllerinde, bazı tübüllerde reaktivite pozitif gözlenirken bazılarında çok az immünreaktivite (→) görülmektedir. f-ERK, hematoxilen zıt boyaması, X100.



Resim 36. Bazı seri hücrelerinde şiddetli (Sg), bazılarında çok az immünreaktivite (→) gözlenmiştir. f-ERK, hematoxilen zıt boyaması, X200.



Resim 37. Diabet grubunda, spermatosit-I'lerin (St1) sadece birkaç tanesinde hafif şiddetde reaktivite, geri kalan kısmında ise hiçbir reaktivite gözlenmemiştir. f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X400.

TARTIŞMA

Diabetes mellitus; insülin salınımındaki yetersizlikle ilişkili olarak karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluk ve hiperglisemi ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır (83-85). Kronik diabetin neden olduğu yan etkileri ortaya koyabilmek amacıyla, deney hayvanlarında oluşturulan diabet modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (3,8,9,10,84).

Deneysel diabetin oluşturulmasında en çok kullanılan maddelerden biri olan STZ, diabetojenik etkisini pankreastaki β hücrelerini tahrip ederek göstermektedir (3,54,84,86).

Diabetes mellitus uzun dönemde; mikro ya da makrovasküler komplikasyonlar, retinopati, nefropati, nöropati, miyokard infarktüsü gibi komplikasyonlarla birçok organ ve sistemi etkiler (4,24,28). Bunların patofizyolojisi oldukça iyi bilinmektedir. Ancak, diabetin üreme sistemi üzerine olan etkileri halen tam olarak anlaşılamamıştır (50,87).

Araştırmacılar deneysel diabet oluşturmak için STZ ya da alloxan gibi farklı ajanları, farklı doz ve sürelerde kullanmışlardır. Pekçok araştırmacı tarafından subdiabetojenik tekrarlayan STZ uygulamaları (5 gün süreyle 40 mg/kg intraperitoneal), deneysel Tip I diabet modeli olarak kabul görmüştür (3,22,88-91). Çalışmamızda STZ uygulaması bittikten 2 gün sonra kan glukoz değerleri ölçülmüş ve 250 mg/dl üzeri olanlar diabetik denekler olarak kabul edilmiştir (5,92,93).

Çalışmamızda, deneysel Tip I diabet modelinin kullanımı ile diabetin testisler üzerindeki morfolojik etkileri literatür bilgisiyle doğrulanmış ayrıca, deneklerin vücut ve testis ağırlıkları, seminifer tübül çapı gibi morfometrik ölçümler de bu doğrulamaya katkıda bulunmuştur (3,22,85,87).

Kontrol grubunda, deney öncesi ve sonrasında vücut ağırlıklarını karşılaştırdığımızda vücut ağırlıklarının arttığını; diabet grubunda deney öncesi ve bitimindeki vücut ağırlıklarını

karşılaştırdığımızda ise vücut ağırlıklarının azaldığını saptadık. Kontrol ve diabet grubu vücut ağırlık değerlerine bakıldığında, diabet sonrası olmasını beklediğimiz şekilde, diabet grubu ağırlık değerlerinin kontrole göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=001$).

Deneklerimizi sakrifiye ettikten sonra ayrı ayrı ölçtüğümüz sağ ve sol testis ağırlıkları; diabet grubunda, kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0,001$). Cai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, testis ağırlığında azalma olduğunu bildirmiş (9), Altay ve arkadaşları ise kontrol grubuna kıyasla diabet grubunda, hem vücut hem de testis ağırlıklarının düşük olduğunu tespit etmişler (22) ve bu bulgular Koh (8,10) ve Shrilatha (50) gibi birçok araştırmacı tarafından desteklenmiştir.

Kontrol ve diabet grubu seminifer tübül çapları karşılaştırıldığında; diabet grubunun seminifer tübül çap değerleri kontrol grubu değerlerine göre, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p=0,001$). Sonuçlarımız bu konuda yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (22,94).

Diabetik hayvanların testis dokularından hazırlanan kesitler, ışık mikroskopunda incelendiğinde; diabete bağlı olarak germinal epitel ve interstisyumda değişiklikler gözlenmiştir.

Çalışmamızda seminifer tübüllere bakıldığında; spermatogenik hücre serisinde hasar ve birbirlerinden ayrılma, bazı tübüllerde aşırı germ hücre kaybı, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, apoptotik hücre sayısında artma, çok nükleuslu dev hücreler, tübül lümeninde görülen sperm yoğunluğunda azalma, tübüler atrofi ve tübül duvarlarında invajinasyonlar olduğu görülmüştür.

Cai ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada, seminifer tübüllerde atrofi gözlemlemişlerdir (9,85). Koh yaptığı çalışmada ayrıca; sperm sayısında azalma, leydig hücrelerinde farklılaşma, spermatogonyum ve spermatositlerde apoptotik hücre ölümünde artma ve hipofizyel-testiküler aksda değişiklikler gözlemlemiştir (10). Bu değişiklikten dolayı; testosteron düzeyinin azaldığını, anormal spermatogenezin ve germ hücre apoptozisinin indüklenebileceği görüşünü savunmuştur.

Altay ve arkadaşları (22) yaptıkları çalışmada; seminifer tübüllerde patolojik kalsifikasyon, germ hücre hasarı, germ hücre odaklarında boşluklar, tübül duvarında hiyalinizasyon, epitel lümeninin hasarlı hücrelerle tıkanması, Sertoli-spermatid bağlantılarında değişiklikler, Sertoli ve Leydig hücrelerinde vakuolizasyon, mikrovasküler değişiklikler ve interstisyel kompartmandaki ekstraselüler matrikste kollajen miktarında artış gözlemlemişlerdir.

Öztürk ve arkadaşları (85) yaptıkları çalışmada; deneysel diabet oluşturmuşlar ve STZ verilen grupta, hücresel yapının bozulduğu tübüller ve atrofik tübüller gözlemlemişlerdir. Bazı tübüllerde sertoli ve spermatogenik seri hücrelerinin tübül duvarında var olduğunu ancak birbirlerinden ayrıldığını belirlemişlerdir. Bazı tübüllerde ise Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında vakuolleşme izlenirken, spermatogenik seri hücrelerinin büyük oranda kaybolduğunu ve bu tübüllerde çok nükleuslu dev hücreleri gözlemlemişlerdir.

Cameron ve arkadaşları (94), insanlarda STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabette; testiste tübüller atrofi, tübül duvarında hiyalinizasyon, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, interstisyel alanda seminifer tübül duvarında ve kan damarı etrafında ekstraselüler alanda kollajen artışı izlemişlerdir.

İnsülinin testosteron salınımını hormonal olarak düzenlediği, kan insülin düzeyindeki düşüşün testosteron düzeyinin düşmesine neden olduğu, insanlarda ve deney hayvanlarında gösterilmiştir. İnsülinin testostereona etki mekanizması, LH ve FSH salgılanmasını baskılayarak çalışmaktadır. Testosteron, Leydig hücreleri tarafından sentezlenerek salgılanır. LH, Leydig hücrelerinin reseptörlerine bağlanır ve testosteron salgılanmasını uyarır. Testosteron hem Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarının gerçekleşebilmesi için, hem de spermatogenezin oluşabilmesi için gerekli bir hormondur. Sertoli hücrelerinden FSH stimülasyonu ile salgılanan androjen bağlayıcı protein, seminifer tübüllerde testosteronun tutulmasını sağlar. Testosteron düzeyinin düşmesi diyabette izlediğimiz testiküler atrofının neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, seminifer tübüllerde sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinin beslenmesi interstisyel bağ doku içindeki kan damarlarından difüzyonla olmaktadır. Bu kan damarları Leydig hücrelerinin ve tübülün beslenmesi için gereklidir. İnterstisyel kan damarlarındaki kalınlaşmaların, tübül beslenmesini azaltarak, tübüller atrofiye neden olabileceği de savunulmaktadır (85).

Jedlinska-Krakowska ve arkadaşlarının (92) yaptıkları çalışmada da, interstisyel alanda ekstraselüler matrikste ve vaskülarizasyonda artış gözlenmiştir. Bu bulguların diabet sonucunda genellikle ortaya çıkması, savunmaya dayalı cevabın oluştuğunu ve toksik maddelere karşı bir bariyerin oluştuğunu kanıtlar biçimindedir. Perivasküler, intertübüller ve peritübüler fibrozis bir savunma reaksiyonunu işaret etmektedir. Savunma reaksiyonlarından biri de hasarlı bölgede fibroblastların proliferasyonudur.

Seminifer tübül hiyalinizasyonu, bazal membranın hiyalin fibröz eozinofilik materyal ile konsantrik kalınlaşmasıdır. Tübül lümenin tümüyle kaplanıp, germinal epitelin ortadan kalkmasına yol açacak düzeylerde izlenebilir. Tübül içerisindeki hiyalinize materyal, kollajen

liflerinden oluşur. Peritübüler fibrozis ise lamina propriyadaki miyofibroblast tabakasının fibröz kalınlaşmasıdır. Nedenleri arasında alkol, bazı toksinler, yangısal değişiklikler sayılabilir. Fibroblastlar birçok patolojik durumda germinal hücrelerden daha dirençli olduklarından, kalıcı olup kollajen üretmekte ve tübülün tamamını kaplamaktadırlar. Patolojik durumlarda miyofibroblastlar ve bazal lamina arasındaki doku kalınlaşabilir. Bu durum, miyofibroblastlardan salındığı düşünülen ara madde birikimine bağlı olabilir (38).

Çalışmamızda ayrıca, diabetik testis dokusunda PCNA ve MAPK sinyal ileti yolunun JNK ve ERK üyelerinin immunreaktivite düzeyleri değerlendirildi. PCNA; germ hücrelerinin proliferasyon durumunu belirlemek için kullanılan ucuz, basit ve doğru bir belirteçtir (22,69). PCNA; proleptoten, leptoten ve pakiten evrelerinde hücre nükleuslarında reaktifken, Sertoli hücre nükleuslarında ise reaktif değildir (22).

Bizim çalışmamızda; PCNA immünreaktivitesi, kontrol grubu testisi seminifer tübüllerinde ve spermatogonyumlarda şiddetli, spermatosit-I'ler ve spermatosit-II'lerde orta derecede reaktifti. Sertoli hücrelerinde PCNA reaktif değildi. Diabet grubunda ise sadece birkaç seri hücrelerinde orta şiddette, çoğunlukla ise hafif immunreaktivite gözlenmişti. Bu değerlendirmeler sonucunda ise PCNA immünreaktivitesinin diabet grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,001$; Tablo 4).

Altay ve arkadaşlarının (22) 2003 yılında Tip I diabet oluşturulmuş sıçanlarla yaptıkları çalışmanın sonuçları; PCNA immünreaktivitesinin, bizim bulgularımızda olduğu gibi düştüğünü göstermiştir. Salama ve arkadaşları da (95), yaşlı Tip II DM'lu deneklerde PCNA düzeyinin azaldığını ve bunun, diabetin rat testis dokusunda oluşturduğu germ hücre azalması veya yokluğu ile paralel bir bulgu olduğunu savunmuşlardır.

Diabetle ilgili yapılan çalışmalarda; diabet sonucu hipergliseminin ortaya çıkışı ile antioksidan savunma sisteminin aktivitesinin bozulduğu, bu yüzden serbest radikal üretiminin arttığı bildirilmektedir. STZ ile indüklenmiş diabetik hayvanlarda, artmış oksidatif strese sıklıkla rastlanmaktadır (64,65,96). Organizmada serbest radikallerin yapım hızıyla, bunların ortadan kaldırılma hızı arasında bir denge vardır ve bu denge oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge korunduğu sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin yapım hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir azalma, bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres durumunda; serbest radikal yapımı ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, doku hasarı meydana gelmektedir (2,4,97).

Spermatogenezisde apoptozis, germ hücre sayısının kontrolünden ve bozuk olan germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasından sorumlu olan fizyolojik bir süreçtir (46,51). Oksidatif stres, hücre siklusunun gen kontrolünü baskılayarak, G1 fazında tutuklu kalmasını indükleyebilir. DNA hasarı sonucundaki serbest radikal artışı, germ hücre apoptozisini hızlandırabilir (92).

Apoptozis veya programlı hücre ölümüne birçok yolak yol açabilir. Ancak apoptozise yol açtığı kesin olarak bilinen iki yolak bilinmektedir.

İlki intrinsik yol; radyasyon, toksine maruziyet veya oksidatif stres gibi hücrede stres yol açan faktörlerle, Bcl-2 ailesinin mitokondri membranını stabilize veya destabilize eden pro-apoptotik ve antiapoptotik (Bax ve Bcl-XL) üyelerini etkiler. Normalde Bcl-2, apoptozisi bloke eder. Bcl-2'nin salınımı, hücre içindeki glutatyon peroksidazı arttırarak antioksidan etki gösterir. Mitokondri membranının bütünlüğünün bozulması, sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkmasına yol açar (Sitokrom C, mitokondri içinde antioksidan ve ROS çöpçüsü gibi görev yapar). Sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ile elektron transport zinciri kesintiye uğrar ve mitokondride aşırı süperoksit üretilmesine neden olur. Sitokrom C ise Apaf-1'e bağlanarak sitoplazmik kaspazları aktive eder. Aktive kaspazlar ise DNAaz enzimini aktive ederek DNA'nın parçalanmasına yol açar (75).

Ekstrinsik yol ise; ekstraselüler ligandların (Fas-ligand, TNF- α) hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere (Fas, TNF reseptörleri) bağlanması ile aktive olur. Bu reseptörlerin aktive olması ile intraselüler kaspazlar aktive olarak DNAaz enzimini aktive ederler ve DNA parçalanır (75).

Kronik oksidatif stres sonucunda, insüline yanıtın azalması, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklara yol açabilir. Yükselen glikoz ve yağ asit düzeyi, ROS üretiminin artışına ve sonucunda da insülin direncine sebep olabilir (98). Üreme sisteminde, ROS üretimi ve antioksidan koruma sistemi arasında denge vardır. Bu dengede ROS düzeyi çok düşük olup, normal sperm fonksiyonunun düzenlenmesi için gereklidir (4). ROS düzeyindeki artış, testis ve spermde oksidatif hasara ve testiküler disfonksiyona neden olarak infertiliteye yol açar. İnfertil çiftlerin yaklaşık %40'ında, ROS düzeyinde artış bulunmuştur (11,4). Artan ROS düzeyi ve insülin direnci arasındaki mekanizma, birkaç sinyal yolağı ile aktifleştirilir. ROS'un sebep olduğu DNA hasarı, hücrelerin apoptozisini hızlandırmaktadır. Bu da infertiliteye sebep olan, sperm sayısının azalması ile üreme üzerine olumsuz bir etki yapmaktadır (99). ROS üretimi sonucunda oluşan oksidatif stres aracılığıyla; TNF- α , IL-6, monosit kemoatraktant protein (MCP-1) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımıyla; JNK, p38 MAPK, kappa B

kinaz inhibitörü gibi stres duyarlı kinazların mRNA düzeyleri aktifleşir. TNF- α , IL-6 ve MCP-1'in, sistemik ve/veya lokal aktifleşmesi de ROS'un üretimini indükler. Böylece pozitif geridönümlü etki mekanizması doğar (11,100). Diabetle artan JNK düzeyinin aktifleşmesi ile beraber, strese yanıt olarak Bcl-2 ekspresyonu azalır (8,11).

MAPK'lar; JNK, ERK ve p38 MAPK olarak üç ana gruba ayrılmaktadır (11,21,42). MAPK'ların oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile aktive olduğu, aktivasyon için fosforilasyona ihtiyaç duyduğu düşünülmektedir. Aktive MAPK'lar çeşitli transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunda ve aktif hale geçmesinde rol oynar (75).

JNK yolağı; oksidatif stresde dahil olmak üzere bunun gibi hücrel streslerle aktifleşir ve apoptozis, stres direnci ve immün yanıtta önemli rol oynar. Nükleusta fosforilasyonu, strese yanıtı ve apoptotik yolları aktifleştirebilir. Akut oksidatif stres fosforile(aktif)-JNK (f-JNK) düzeyinin nükleusta artışına, kronik oksidatif stres ise f-JNK'nin sitoplazmik alanda artmasına yol açmaktadır (98). Oksidatif stres ve aktive olan JNK, diabetle bağlantılı olan genlerin ifade düzeylerini değiştirebilir (101).

Biz çalışmamızda t-JNK ve f-JNK düzeylerinin diabet oluşturduğumuz deneklerde, kontrol grubu deneklerimize göre oldukça yüksek olduğunu; ayrıca t-JNK immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre, diabet grubundaki artışının; istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ($p=0,125$; Tablo 4), f-JNK immünreaktivitesinin ise anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik ($p=0,002$; Tablo 4). Ayrıca t-JNK ve f-JNK immünreaktiviteyi arasındaki farkı karşılaştırdığımızda; her iki grupta da f-JNK aktivasyonunun t-JNK'ya göre anlamlı derecede yüksek olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0,001$; Tablo 4).

Tip I ve Tip II diabetin patojenezinde inflamatuvar olaylar önemli rol oynamaktadır. TNF- α , IL-1 β , IL-6 ailesindeki bazı sitokinler, IL-8 ve bazı kimokinler diabetin her iki çeşidinde de inflamasyonda etkilidirler (102). Tip I diabet modeli oluşturulan deneklerde, pankreatik adacıklarda TNF- α ekspresyonunun artışı ile beraber, IL-12 ailesindeki sitokinlerden IL-23 ve IL-27'nin de artarak Tip I diabeti indüklemiş olabileceği bildirilmektedir (90-91). IL-6'nın plazma düzeyinin ise insülin direnci ile bağlantılı, vücut ağırlığından bağımsız olarak diabet riskini artırdığı ileri sürülmüştür. Yüksek doz IL-6 verilmesi sonucu, sağlıklı insanlarda insülin direnci gelişebilmektedir. TNF- α da, glukozun indüklediği insülin sekresyonunu inhibe eder. Bu durum, insülinin DNA koluna zarar verebilir ve Bcl-2 aracılığıyla β hücre apoptozisini artırabilir. TNF- α 'nın yağ dokusunda yüksek miktarda salınıp, insülin direncinin gelişmesinde önemli rol oynadığı bulunmuştur.

Birçok çalışmada, yüksek oranda bulunan adipositokinlerin (leptin, TNF- α , IL-6) diabet riskini artırdığı ifade edilmektedir (93).

Araştırmamızda gözlemlediğimiz diabetik deneklerimizin testis dokusundaki JNK artışının; diabetin regülasyonunda rolleri olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 vb. gibi birçok sitokin ve kimokinin, gen ve protein düzeylerindeki değişiklikler sebebiyle ortaya çıktığını ve bu sebeple de testis dokusunda apoptozis mekanizmasının indüklendiğini düşünmekteyiz. Ayrıca diabet grubunda PCNA immunreaktivitesinde gözlemlediğimiz düşüş; testis dokusundaki proliferasyonun çok azaldığını gösterirken, JNK'nın artması da apoptotik yolağın aktiflediğini gösteriyor olabilir. Diabetik erkek deneklerde testis dokusunda gözlenen germ epitelindeki hasar ve hücre kayıplarının da bu sebeple ortaya çıktığı düşünülebilir.

Çalışmamızda araştırdığımız MAPK ailesinin diğer üyesi ERK ise tübül germinal epitelinin proliferasyonunda oldukça önemli bir proteindir. Testis germ hücrelerinde ERK baskın olarak nükleusta yerleşiktir. ERK'nın; gen transkripsiyonu ve substrat fosforilasyonunu etkileyerek, hücre proliferasyonunu düzenlediği düşünülmektedir (103).

Çalışmamızda kontrol grubundaki t-ERK ve f-ERK immunreaktiviteleri karşılaştırıldığında; anlamlı derecede azalma ya da artış bulunmamasına rağmen; diabet grubunda f-ERK'nın, t-ERK'ya göre anlamlı derecede düşük ($p=0,001$; Tablo 4) olmasının, germ hücre proliferasyonundaki azalma ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca spermatid ve Sertoli hücreleri arasındaki bağlantılarda sentezlenen ERK'nın fosforilasyonunun, buralarda bulunan proteinler arasındaki iletişimin bozulmasını sağladığı ve böylece olgun spermin lümene geçmesini kolaylaştırdığı görüşünden yola çıkarak (104); diabetik testis dokularında lümeninde oldukça az rastladığımız spermlerin f-ERK miktarındaki düşüş ile ilişkili olabileceği ve bu düşüşün ERK'nın steroid hormonlardan da etkilediğini göze aldığımızda, bu sonucun normal bir bulgu olduğu kanaatindeyiz.

MAPK ailesinin hücre proliferasyonu ile ilgili üyesi olan ERK immunreaktivitesi değerlendirmelerimizin, PCNA bulgularımız ile de uyumlu olduğu açıktır.

Diabetin erkek hastalarda infertiliteye sebep olduğu olguların tedavisinde elde ettiğimiz sonuçların katkı sağlayacağı düşüncesinde olmakla birlikte, diabetik infertilitenin açıklanabilmesi için daha ileri düzeydeki çalışmalara ihtiyaç duyulduğu da yadsınmaz bir gerçektir.

SONUÇ

“Diabetes mellitus” morbiditeye, mortaliteye ve tedavisinden dolayı ekonomik kayba neden olan metabolik bir hastalıktır. Diabetin özellikle erkek üreme sistemi üzerine olan etkileri hala tam olarak anlaşılammıştır.

Çalışmamızda; STZ ile deneysel diabet oluşturulmuş sıçanların testis dokularında, DM'nin yan etkilerine bağlı olarak; PCNA ve MAPK (JNK ve ERK) hücre immünreaktivitelerinde ortaya çıkacak değişiklikleri değerlendirmeyi ve böylece DM'li bireylerde testis dokusunda görülen normal olmayan spermatogenezis ve apoptozis mekanizmasını aydınlatmayı, bu sebeple infertil olan erkek bireylerin tedavi süreçlerine destek olmayı planladık.

Diabetik deneklerimizde kan glukoz değerlerinin, kontrole göre anlamlı derecede yükseldiğini ($P=0.001$), vücut ve testis ağırlıkları ile seminifer tübül çaplarının ise anlamlı derecede azaldığını ($P=0.001$) gözlemledik. Diabetik deneklerimizde ışık mikroskopik incelemelerde testis dokusunda gözlemlediğimiz hasarın, literatür değerlendirmeleri ile uyumlu olduğunu gözlemledikten sonra yapılan immünohistokimyasal incelemelerde; kontrol grubuna kıyasla diabetik deneklerimizde, PCNA immünreaktivitesinin anlamlı derecede azaldığı ($P<0.001$) sonucuna vardık. Ayrıca kontrol ve diabet grubu karşılaştırıldığında t-JNK immünreaktivitesinde farklılık bulunmazken, f-JNK immünreaktivitesinin diabetik grupta arttığını ($P=0.002$), t-ERK ve f-ERK immünreaktivitesinin ise azaldığını ($P=0.004$, $P<0.001$) gözlemledik.

Sonuç olarak veriler gözönünde bulundurulduğunda, diabet sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres mekanizmasına bağlı olarak; diabetin düzenlenmesinde rolleri olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 vb. gibi birçok sitokin ve kimokinin, gen ve protein düzeylerinin değişerek,

JNK'nın aktifleşmesine neden olabileceği; bu sebeple apoptozisin ortaya çıkabileceğini ve bu durumun da infertiliteye sebep olabileceğini düşünmekteyiz. Diabetle beraber oluşan androjen seviyesindeki düşüşün, t-ERK ve f-ERK, immünreaktivitelerinin azalmasına katkı sağlamış olabileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Diabetik erkeklerde gözlenen azalmış testosteron düzeyi ve anormal spermatogenezis gibi önemli değişiklikler sebebiyle ortaya çıkan infertilite olgularına katkı sağlamak amacıyla, proliferen hücre nükleer antijeni ve mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz'ların aktifleşme mekanizmalarını incelemeyi planladık.

Aynı biyolojik ve fizyolojik koşullar altında tuttuğumuz Sprague Dawley erkek sıçan deneklerimizden; kontrol grubu (n=8) ve 5 gün peşpeşe 40mg/kg streptozotosin uyguladığımız diabet grubu (n=12) olmak üzere iki grup oluşturduk. Altı hafta boyunca kan-glukoz düzeyleri ve vücut ağırlıkları ölçülen deneklerimizin testis biyopsi materyallerini alarak, ışık ve immünohistokimyasal gözlemlerimiz için işlemlendirdik. Morfometrik olarak da; vücut ve testis ağırlıkları ile seminifer tübül çaplarını değerlendirdik.

Deney grubunda streptozotosin uygulanması sonrası ölçülen kan-glukoz değerleri (>250 mg/dl) diabetin oluştuğunu gösterir şekilde artarken; vücut ve testis ağırlıkları ile seminifer tübül çaplarının azaldığı (P=0.001) bulunmuştur. Testis dokusunda izlenen histolojik değişiklikler ise testis dokusunda diabetin sebep olduğu bilinen bulgularıdır.

Prolifere hücre nükleer antijeni ve mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz (ERK ve JNK)'ların immunreaktiviteyi karşılaştırıldığında, kontrol kıyasla diabet grubunda; proliferen hücre nükleer antijeni azalırken (P<0.001), t-JNK artışının anlamlı olmadığı (P=0.125), f-JNK immünreaktivitesinin yüksek olduğu (P=0.002) gözlenmiştir. Kontrol grubu ve diabet gruplarındaki t-JNK ve f-JNK immünreaktiviteyi arasındaki fark karşılaştırıldığında ise f-JNK aktivasyonu, t-JNK'ya göre anlamlı derecede yüksek (P<0.001) bulunmuştur.

t-ERK ve f-ERK immünreaktiviteyi kontrolle göre diabet grubunda, anlamlı derecede azaldığı (P=0.004 ve P<0.001) gözlemlenmiştir. Ayrıca kontrol grubunda t-ERK ve

f-ERK aktivasyonları değişmezken ($P=0.0170$); deney grubunda t-ERK'ya göre f-ERK immunreaktivitesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P=0.001$).

Sonuç olarak, diabetin sebep olduğu infertilite olgularında mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz'ların rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Testis, Streptozotosin, MAPK.

MAPK IMMUNOREACTIVITY IN STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RAT TESTIS

SUMMARY

We aimed to examine the activation mechanisms of proliferating cell nuclear antigens and mitogen activated protein kinases to contribute infertility cases which are emerged by important changes that are seen in diabetic men like decreased testosterone levels and abnormal spermatogenesis.

We composed two groups from our male Sprague Dawley rat subjects which were kept under the same biological and physiological conditions; an diabetic groups which streptozotocin is implemented for 5 days 40 mg daily dosages (n=12) and control group (n=8). We collected testicular biopsy materials of our subjects which blood glucose levels and body weights are measured for 6 weeks and processed for our light and immunohistochemical observations. Morphometrically; we evaluated body and testis weights and seminiferous tubule diameters.

In the diabetic groups body and testis weights and seminiferous tubule diameters are decreased, while the blood-glucose levels are increased after streptozotocin administration demonstrating that diabetes has emerged. Histological changes that are seen in testicular tissue are known findings of diabetes.

When the immunoreactivities of proliferating cell nuclear antigen and mitogen activated protein kinases (ERK and JNK) are compared it is observed that proliferating cell nuclear antigen is decreased ($P<0.001$), t-JNK is not significantly increased ($P=0.125$) and f-JNK immunoreactivity is higher in the diabetic group ($P=0.002$). When t-JNK and f-JNK

immunoreactivities are compared between the control and diabetic, it is found that f-JNK activation is significantly higher than t-JNK activation ($P < 0.001$).

It is observed that, in the diabetic group t-ERK and f-ERK immunoreactivities are significantly decreased ($P = 0.004$ and $P < 0.001$) when compared to control group. Also, f-ERK immunoreactivities are significantly decreased ($P = 0.001$) in the experimental group while the t-ERK and f-ERK activations are not changed in the control group ($P = 0.0170$).

In conclusion, we think mitogen activated protein kinases can have roles in infertility cases caused by diabetes.

Keywords: Diabetes mellitus, Testis, Streptozotocin, MAPK

KAYNAKLAR

1. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. İliçin G, Ünal S (Editörler). İç Hastalıkları'da. 2.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi;2003. s.2279-91.
2. Altan N, Dincel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Turk J Biochem 2006;31(2):51-6.
3. Kızılay G, Uygun M. Structural changes in tunica mucosa cells of bladder in rats with experimental diabetes mellitus. Pak J Biol Sci 2005;8(2):181-5.
4. Aybek H, Aybek Z, Rota S, Sen N, Akbulut M. The effects of diabetes mellitus, age, and vitamin E on testicular oxidative stress. Fertil Steril 2008;90(3):755-60.
5. Dönmez S. Deneysel diyabetik nefropatide irbesartan ve antioksidan tedavilerin karşılaştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
6. Agbaje IM, Rogers DA, Mcvicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. Human Reproduction 2007;22(7):1871-7.
7. Kefee JH, Bell DSH, Wyne KL, Haffner SM. (Çeviri: AS. Gündoğdu). Diabet esasları. 1. baskı. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2006.s.3-11.
8. 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.
9. Cai L, Shali C, Evans T, Mukherje D, Chakrabarti S. Apoptotic germ cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. Urol Res 2000;28:342-7.
10. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pbad/14-3-3 in rat testis. Life Sci 2007;81(13):1079-84.

11. Ranawat P, Bansal MP. Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: possible involvement of p38 and JNK MAPKs-in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 2008;309(1-2):21-32.
12. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270(5240):1326-31.
13. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004;23(16):2838-49.
14. Ichijo H. From receptors to stress-activated MAP kinase. *Oncogene* 1999;18(45):6087-93.
15. Thompson NA, Haefliger JA, Senn A, Tawadros T, Magara F, Ledermann B, et al. Islet-brain1/JNK-interacting protein-1 is required for early embryogenesis in mice. *J Biol Chem* 2001;276(30):27745-8.
16. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10.baskı. Ankara: Hacettepe taş kitapçılık; 2002.s.270,1169.
17. Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Üniv Tıp Fak Derg* 2004;35:34-42.
18. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions *Endocr Rev* 2001;22(2):153-83.
19. Farooq A, Zhou MM. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 2004;16:769–79.
20. Bayarsaikhan M, Shiratsuchi A, Gantulga D, Nakanishi Y, Yoshioka K. Selective expression of the scaffold protein JSAP1 in spermatogonia and spermatocytes. *Reproduction* 2006;131(4):711-9.
21. Kizilay G, Cakmak H, Yen CF, Atabekoglu C, Arici A, Kayisli UA. Expression and regulation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in endometrial cells in vivo and in vitro. *Histochem Cell Biol* 2008;130(4):761-71.
22. 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(2):828-31.
23. Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith L. (çeviri: S. Gündoğdu). *Cecil essential of medicine*. 2.baskı. İstanbul: Yüce Yayınları;1990. s.733-45.
24. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(1):5-20.
25. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fak Derg* 2005;3:30-9.

26. Özkan Y, Koca SS, Mengüçük E, Genç V, Dönder E. Rosiglitazonun metformin kullanan tip 2 diabetes mellitus'lu hastalarda serum homosistein ve leptin düzeylerine etkileri. *Fırat Tıp Derg* 2004;9(3):86-90.
27. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002;54(3):375-429.
28. Mallidis C, Green BD, Rogers D, Agbaje IM, Hollis J, Migaud M, et al. Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Int J Androl* 2009;32(2):156-65.
29. National Diabetes Fact Sheet. General Information, [serial online]. 2007 <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet07.htm>.
30. National Diabetes Fact Sheet. General Information [serial online]. 2003. <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet07.htm>
31. Deveci SE, Açık Y, Güler H, Gülbayrak C. Elazığ emniyet müdürlüğü kurum hekimliğine başvuran emniyet teşkilatı çalışanı ve eşlerinde koroner arter hastalıkları risk faktörleri araştırması. *Tsk Koruyucu Hekimlik Bülteni* 2006;5(4):235-43.
32. Kierszenbaum AL (Çeviri: R. Demir.). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006:531-544.
33. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. Malatya; Pelikan Yayıncılık, 2004:310.
34. Sawada H, Esaki M. Electron microscopic observation of ¹³⁷Cs-irradiated rat testis: production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *J Electron Microsc* 2003;52:391-7.
35. Ross HM, Romrell JL, Kaye IG. Male Reproductive System, In; Coryell A. P. (ed.). *Histology a text and atlas*. 3th ed, Maryland: Williams and Wilkins; 1995:p.636-54.
36. Junqueira LC, Carneiro J (Çeviri: Y. Aytekin, S. Solakoğlu). *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitabevi; 2006:431-47.
37. Şeftalioğlu A. *İnsan Embriyolojisi Genel ve Özel*. 3.Baskı, Ankara; Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd Şti, 1998: 348-50.
38. Apa DD, Polat A, Çayan S. İnfertil testis biyopsilerinde fibrozisin vimentin ve alfa-düz kas aktini ile değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Ecopathology* 2002;8(1-2):11-5.
39. Eroschenko VP (Çeviri: R. Demir). *di Fiore Histoloji Atlası*. Palme Yayıncılık; 2001:283-6.
40. Govender D, Sing Y. Sertoli cell nodules in the undescended testis: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study of hyaline deposits. *R J Clin Pathol* 2004;57:802-6.

41. Siu MK, 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.
42. Yu X, Sidhu JS, Hong S, Faustman EM. Essential role of extracellular matrix (ECM) overlay in establishing the functional integrity of primary neonatal rat Sertoli cell/gonocyte co-cultures: an improved in vitro model for assessment of male reproductive toxicity. *Toxicol Sci* 2005;84(2):378-93.
43. Guitton N, Touzalin AM, Sharpe RM, Cheng CY, Pinon-Lataillade G, Méritte H, Chenal C, et al. Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the pre-pubertal rat after acute irradiation of the testis. *Int j androl* 2000;23:332-9.
44. Demir R, Gametogenez, Demir R. (Ed.) İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi'de. Ankara: Palme Yayıncılık; 1995. s.24-34.
45. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev reprod* 1999;4:38-47.
46. Abe K, Eto K, Abe S. Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;250:113-26.
47. Moore L.K, Persaud T.V.N., (Çeviri: S. Müftüoğlu, P. Atilla, F.Kaymaz). Embriyoloji Ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Ankara: Güneş kitabevi; 2009:12-16.
48. Drews U, (Çeviri: Y. Aytekin, E. Gürsoy, S. Solakoğlu). Renkli Embriyoloji Atlası. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri; 2000:16-20.
49. Aktan G, Şanlı Ö, Kadioğlu A. Sperm kromatin hasarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemler. *İnfertilite* 2005. <http://www.androloji.org.tr/images/file/infertilite>.
50. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in STZ-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol* 2007;23(4):578-87.
51. Osada Y, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Involvement of mitogen-activated protein kinases in class B scavenger receptor type I-induced phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 2006;312(10):1820-30.
52. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2002;9(2):143-8.
53. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *Adü tıp fakültesi dergisi* 2008;9(3):51-61.
54. Sanguinetti RE, Ogawa K, Kurohmaru M, Hayashi Y. Ultrastructural changes in mouse leydig cells after streptozotocin administration. *Exp Anim* 1995;44(1):71-3.
55. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.

56. Bell RH Jr, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 1983;35(5):433-60.
57. Dökmeçi İ. Antikanser ilaçlar. Farmakoloji temel kavramlar'da. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000. s.998.
58. Razaa H, Ahmedb I, Johna A. Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S-transferase in streptozotocin induced diabetic rats: Modulation by *Momordica charantia* (karela) extract. *Life Sciences* 2004;74:1503–11.
59. Fazan SVP, De vasconcelos CCA, Valença MM, Nessler R, Moore KC. Diabetic peripheral neuropathies: a morphometric overview *int. J Morphol* 2010;28(1):51-64.
60. West E, Simon OR, Morrison EY. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J* 1996;45(2):60-2.
61. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 1996;52(4):344-7.
62. Bolaffi JL, Nagamatsu S, Harris J, Grodsky GM. Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation, of streptozotocin inhibition of insulin secretion. *Endocrinology* 1987;120(5):2117-22.
63. Akpan JO. Reduction in blood and urine glucose levels in streptozotocin and alloxandibetes by phenazine methosulfate. *Acta Diabetol Lat* 1989;26(3):195-201.
64. Arulselvan P, Subramanian SP. Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic beta-cells in experimental diabetes in rats. *Chem Biol Interact* 2007;165(2):155-64.
65. Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S. Antioxidant effect of aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological Rep* 2005;57:90-6.
66. Chen H, Carlson EC, Pellet L, Moritz JT, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in pancreatic beta-cells reduces streptozotocin-induced DNA damage and diabetes. *Diabetes* 2000;50(9):2040-6.
67. Burçak G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2004;35(4):159-69.
68. Avunduk MC, Tavlı Ş, Yol S, Tavlı L, Yavuz A, Güngör S, Yılmaz O. Mide karsinomlarında hücre proliferasyon belirleyicisi olarak pcna, ki-67 ve agnor kullanımı. *Ank Üniv Tıp Fak Mecm* 2000;53(1):11-5.
69. Şen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdogan B. Meningiomlarda histopatolojik tanının flowsitometrik dna analizi, pcna ve ki-67 ile korelasyonu. *Türk Nöroş Derg* 2002;12:48-53.

70. Dierendonck JHV, Wijsman JH, Keijzer R, Velde CHVJ, Cornelisset CJ. Cell-cycle-Related Staining Patterns of Anti-proliferating Cell Nuclear Antigen Monoclonal Antibodies Comparison with BrdUrd Labeling and Ki-67 Staining. *American Journal of Pathology* 1991;138(5):1165-72
71. Cooper GM, Hausman RE. (Çeviri Editörleri: M. Sakızlı, N. Atabey.) *Cell moleküler yaklaşım*'da. 3. baskı. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi; 2006. s.565.
72. Hsu S, Augusta, Georgia. Yeşil çay ve deri. *J Am Acad Dermatol* 2005;2(3):210-8
Çeviren: Dr. Emek Özgür Kocatürk
73. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002;20:55-72.
74. Katou S, Yoshioka H, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Mori H, et al. Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol* 2005;139(4):1914-26.
75. Görür S, Helli A, Orhan İ. Testis torsiyonu patofizyolojisi ve tedavisinde yeniliker. *İnfertilite*. 214-229.
76. Reno EM, Haughian JM, Jackson TA, Thorne AM, Bradford AP. c-Jun N-terminal kinase regulates apoptosis in endometrial cancer cells. *Apoptosis* 2009;4(6):809-20.
77. Zhang XS, Zhang ZH, Guo SH, Yang W, Zhang ZQ, Yuan JX, et al. Activation of extracellular signal-related kinases 1 and 2 in Sertoli cells in experimentally cryptorchid rhesus monkeys. *Asian J Androl* 2006;8(3):265-72.
78. Köksoy AA. Damar düz kası proliferasyonunda sinyal iletimi. *Ank üniv tıp fak mecm* 2002; 55(4):297-306.
79. Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M, Uzal MC. Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubües damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Arch Toxicol*. 2009;83(8):735-46.
80. Murk W, Atabekoglu CS, Cakmak H, Heper A, Ensari A, Kayisli ÜA, Arici A. Extracellularly signal-regulated kinase activity in the human endometrium: possible roles in the pathogenesis of endometriosis. *Endocrine Research J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3532-40.
81. Demir R, Yılmaz S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun T, Akkoyunlu G. İmmunohistokimya uygulamaları ve örnek potokoller. Demir R.(editör) *Histolojik boyama teknikleri*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001: 290-1.
82. Çırpanlı T, Akercan F, Terek MC, Özçakır HT, Giray G, Sağol S, Karadaş N. Preeklampsi hastalarının plasentalarında immünohistokimya metodu ile VEGF, EGF-R VE TGF- α bakışı. *Türk Jin ve Obstetrik Derneği Derg* 2008;5(1):40-5.

83. Karahan EG, Özesmi Ç, Süer C, Gölgeli C, Dolu AN. Hipergliseminin uyarılma potansiyelleri üzerine etkisinin streptozotosin ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda incelenmesi. Sağlık bilimleri derg (journal of health sciences) 2005;14(3):171-6.
84. Karabay G, Erdoğan D, Take G, Karasu Ç. Deneysel diyabette probukol uygulanmasının endokrin pankreas dokusuna etkisinin ultrastrüktürel olarak incelenmesi. Uludağ Üniv Tıp Fak Derg, 2005;31 (1) 5-8.
85. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. T Klin J Med Sci 2002; 22:173-8.
86. Yono M, Pouresmail M, Takahashi W, Flanagan JF, Weiss RM, Latifpour J. Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2005;372:251-5.
87. Ballester J, Dominguez J, Munoz MC, Sensat M, Rıgau T, Gumovart JJ and et al. Tungstate treatment improves leydig cell function in Streptozotocin-diabetic rats. Journal of Andrology,2005; 26(6).
88. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. Science 1976;193(4251):415-7.
89. Cossel L, Schneider E, Kuttler B, Schmidt S, Wohlrab F, Schade J et al. Low dose streptozotocin induced diabetes in mice. Metabolic, light microscopical, histochemical, immunofluorescence microscopical, electron microscopical and morphometrical findings. Exp Clin Endocrinol 1985;85(1):7-26.
90. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamisi M, Wei X, Lukic ML. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. Eur J Immunol 2006;36(1):216-23.
91. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamsi M, Lukic ML. New members of the interleukin-12 family of cytokines: IL-23 and IL-27 modulate autoimmune diabetes. Ann N Y Acad Sci 2006;1079:157-60.
92. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski AJ Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. Reprod Dev 2006;52(2):203-9.
93. Hajer GR, Haften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. European Heart Journal 2008; 29: 2959-71.
94. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. Anat Rec 1985;213:53-62.
95. Salama M, Tsuji M, Tamura M, Kagawa S. Impact of aging and diabetes mellitus on the expression of the proliferating cell nuclear antigen in rat testicular tissue. Arch Androl 1998;40(2):95-107.

96. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa JI, Matsuoka TA, Fujitani Y, Umayahara Y and et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes possible protection of pancreatic b-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999; 48: 2398-406.
97. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep* 2004;9(3):145-52.
98. Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem* (Epub ahead of print) 2010.
99. Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *F.ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2006;20(1):85-95.
100. Lamb RE, Goldstein BJ. Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. *Int J Clin Pract* 2008; 62(7): 1087–95.
101. Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):420-5.
102. Kristiansen OP, Poulsen TM. Interleukin-6 and diabetes the good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes* 2005; 54(2): 114-24.
103. Chieffi P, Colucci-D'Amato GL, Staibano S, Franco R, Tramontano D. Estradiol-induced mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *J Endocrinol* 2000;167(1):77-84.
104. Cheng J, Watkins SC, Walker WH. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology* 2007;148(5):2066-74.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. STZ'nin kimyasal yapısı	11
Şekil 2. MAPK sinyal yolağı.....	15
Şekil 3. Kontrol ve diabet gruplarının PCNA, t-JNK, f-JNK, t-ERK ve f-ERK değerlerinin karşılaştırılması	26

Resimler

Resim 1: Kontrol grubu, H+E, X100	29
Resim 2: Kontrol grubu, H+E, X200	29
Resim 3: Diabet grubu, H+E, X100.....	30
Resim 4: Diabet grubu, H+E, X200.....	30
Resim 5: Diabet grubu, H+E, X200.....	31
Resim 6: Diabet grubu, H+E, X400.....	31
Resim 7: Diabet grubu , H+E, X400.....	32
Resim 8: Kontrol grubu, PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X200	32
Resim 9: Kontrol grubu, PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X400	33
Resim 10: Diabet grubu, PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X100	33
Resim 11: Diabet grubu, PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X200	34
Resim 12: Diabet grubu, PCNA, hematoksilin zıt boyaması, X200	34

Resim 13: Diabet grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X400	35
Resim 14: Kontrol grubu, t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X100	35
Resim 15: Kontrol grubu, t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200	36
Resim 16: Kontrol grubu, t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400	36
Resim 17: Diabet grubu, t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X100.....	37
Resim 18: Diabet grubu, t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	37
Resim 19: Diabet grubu, t-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	38
Resim 20: Kontrol grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X100.....	38
Resim 21: Kontrol grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	39
Resim 22: Kontrol grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	39
Resim 23: Diabet grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X100.....	40
Resim 24: Diabet grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X200.....	40
Resim 25: Diabet grubu, f-JNK, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	41
Resim 26: Kontrol grubu, t-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X100	41
Resim 27: Kontrol grubu, t-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X200	42
Resim 28: Kontrol grubu, t-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X400	42
Resim 29: Diabet grubu, t-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X100	43
Resim 30: Diabet grubu, t-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X200	43
Resim 31: Diabet grubu, t-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X400	44
Resim 32: Kontrol grubu, f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X100	44
Resim 33: Kontrol grubu, f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X200	45
Resim 34: Kontrol grubu, f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X400	45
Resim 35: Diabet grubu, f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X100	46
Resim 36: Diabet grubu, f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X200	46
Resim 37: Diabet grubu, f-ERK, hematoksilen zıt boyaması, X400	47

Tablolar

Tablo 1. Kontrol ve diabet gruplarına ait kan glukoz düzeyi değerlerinin takibi	22
Tablo 2. Kontrol ve diabet gruplarına ait vücut ve testis ağırlıkları değerleri.....	23
Tablo 3. Kontrol ve diabet gruplarının seminifer tübül çap değerlerinin karşılaştırılması.....	23
Tablo 4. Kontrol ve diabet gruplarının PCNA, t-JNK, f-JNK, t-ERK ve f-ERK değerlerinin karşılaştırılması.....	25

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Niğde’de doğdum. Ortaöğretimimi İstanbul Bağcılar Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2002 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesinde lisans eğitimime başladım. 2007 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ



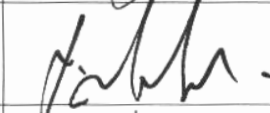

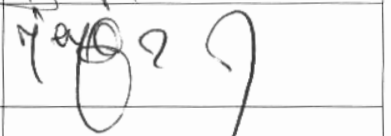



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı:8

Karar Tarihi: 31.08.2009

KARAR NO: 2009/08.06

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Gülnur KIZILAY'ın yaptığı Yeliz BOZDEMİR yüksek lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK- 2007/062 protokol nolu "Deneysel Diabet Oluşturulmuş Sıçanların Testis Dokularında MAPK immünreaktivitesinin incelenmesi" başlıklı çalışma görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN 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 type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	