



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL DİYABETTE
EKZOJEN OLARAK UYGULANAN OKSİTOSİNİN SIÇAN TESTİSİ ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PINAR KÖROĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk

İSTANBUL-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL DİYABETTE
EKZOJEN OLARAK UYGULANAN OKSİTOSİNİN SIÇAN TESTİSİ ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PINAR KÖROĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Tez Sahibi : Pınar Köroğlu

Tez Başlığı : Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabette ekzojen olarak uygulanan oksitosinin sıçan testisi üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi

Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi

Sınav Tarihi : 27 Eylül 2012

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

.Kurumu

İmza

.Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve . . . sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Enis ÖZYAR

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

07.09.2012

Biyolog Pınar Koroğlu

TEŞEKKÜR

Tezimin gerçekleşmesinde vermiş olduğu katkılardan dolayı başta

Acıbadem Üniversitesi Rektörlüğü 'ne

teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, hep desteğini gördüğüm danışman hocam

Yrd. Doç. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk 'e,

yüksek lisans eğitimimin başından beri ilgisini gördüğüm, her konuda bilgisinden yararlandığım, tez çalışmam sırasında da bilimsel katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen

Anabilim Dalı başkanımız

Prof. Dr. Serap Arbak 'a,

katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Deniz Yücel'e,

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AbD başkanı Prof. Dr.

Feriha Ercan 'a, elektron mikroskopik preparasyondaki yardımlarından dolayı Kim. Müh.

Necati Yurdakul'a, ışık mikroskopideki yardımlarından dolayı Tek. Ünal Devrim'e, hayvan deneylerindeki yardımlarından dolayı Marmara Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve

Araştırma Merkezi sorumlusu Vet. Hek. Dilek Özbeyli 'ye,

Biyokimyasal incelemelerdeki çok değerli katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi Biyokimya AbD öğretim üyesi Prof. Dr. Fikriye Uras ve

Öğr. Gör. Dr. Özlem Özakpınar Bingöl 'e

Diyabet modelimin oluşturulmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi,

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AbD öğretim üyesi Prof. Dr. Melek Öztürk Sezgin 'e

ve Dr. Matem Tunçdemir 'e,

Histolojik boyamalardaki yardımlarından dolayı Acıbadem Üniversitesi Sağlık Meslek

Yüksekokulu Patoloji Teknikerliği Programı Öğr. Gör. Dr. Serap Uslu 'ya,

Öğr. Gör. Gülsün Ekicioğlu'na,

tez projesi yazım aşamasında biyokimyasal düzeydeki katkılarından dolayı Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AbD başkanı Prof. Dr. Aysel Özpınar 'a ve

Yrd. Doç. Dr. Özge Can 'a

sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3-4
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Testis Histolojisi	5-6
4.1.1. Seminifer tübüller	7-11
4.1.2. Testisin histofizyolojisi	11
4.1.3. Kan-testis bariyeri ve sıkı bağlantılar	12-13
4.2. Diyabet	13-15
4.2.1. Diabetes mellitusun tipleri ve klinik özellikleri	13-14
4.2.2. Diyabet oluşumuna etki eden faktörler	15
4.3. Deneysel Diyabet Modelleri	15-20
4.3.1. Streptozotosin (STZ)	16
4.3.2. Streptozotosin ve erkek üreme sistemi	17
4.3.3. Diyabet ve oksidatif stress	17-18
4.3.4. Oksidatif stres ve antioksidan ilişkisi	19-20
4.4. Oksitosin	20-21
4.4.1. Oksitosinin erkek üreme sistemi ve diğer sistemler üzerine etkileri	21-22
5. GEREÇ VE YÖNTEM	23-25
5.1. Histopatolojik Preparasyon	26
5.1.1. Işık mikroskopisi metodu	26-29
5.2. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Metodu	29-30
5.3. Biyokimyasal İnceleme	30-32
5.4. İstatistiksel Analiz	33
6. BULGULAR	34
6.1. Deneyde Kullanılan Hayvanların Ağırlıkları	34
6.2. Testis Ağırlığı	34

6.3. Deney Hayvanlarının Kan Glukoz Düzeyleri	36
6.4. Işık Mikroskopisi Bulguları	38
6.4.1. Histopatolojik bulgular	38-43
6.4.2. Seminifer tübül histopatolojik skorlama bulguları	44
6.5. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Bulguları	45-54
6.6. Biyokimya Bulguları	55-56
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	57-64
8. KAYNAKLAR	65-69
9. ETİK KURUL ONAYI	70
10. ÖZGEÇMİŞ	71-74

1. ÖZET

Bu çalışmada streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda diyabet öncesi ve sonrası oksitosinin tedavi edici ve koruyucu etkisini göstermek amaçlanmıştır. Wistar albino erkek sıçanlar dört gruba ayrıldı; 1) Kontrol grubu (n: 6): sıçanlara 0,3 ml serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi, 2) STZ grubu (n: 6): 65 mg/kg tek doz STZ i.p. olarak uygulandı ve 4 hafta bekletildi, 3) Oksitosin ön uygulama grubu (n: 6): 5 ng/kg oksitosin i.p. olarak 5 gün boyunca uygulandıktan sonra, tek doz STZ (65 mg/kg) i.p. olarak uygulandı ve 4 hafta bekletildi 4) Oksitosin tedavi grubu (n: 6): tek doz STZ (65 mg/kg) i.p. olarak enjekte edildikten 4 hafta sonra 5 µg/kg oksitosin 5 gün boyunca i.p. olarak uygulandı. Deneyin başında ve deney süresince sıçanlardan alınan kan örnekleri glukometre ile ölçüldü ve glukoz değerleri 200 mg/dl'den yüksek olan sıçanlar çalışmaya dâhil edildi. Uygulamalardan sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Testis doku örnekleri ışık ve geçirimli elektron mikroskopi için, kan örnekleri ise malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) ölçümleri için alındı. Testis doku örneklerinden alınan parafin kesitlere histopatolojik skorlama için Hematoksilin ve Eosin (H&E) ve Periyodik asit-Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı. Özellikle oksitosin uygulanan gruplarda; geçirimli elektron ve ışık mikroskopi bulgularında da STZ grubuna kıyasla histopatolojik hasarın anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Oksitosin ön uygulama grubunda oksitosin tedavi grubuna kıyasla histopatolojik hasarın anlamlı olarak azalması dikkati çekti. MDA bulgularında oksitosin uygulanan gruplarda STZ grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenirken; GSH bulgularında oksitosin uygulanan gruplarda STZ grubuna göre anlamlı bir artış; AOPP'de ise oksitosin uygulanan gruplarda STZ grubuna göre anlamlı azalma gözlemlendi. Bu bulgular ışığında oksitosinin testiste oluşan diyabet hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Sonuç olarak, diyabette oluşan testis hasarına karşı oksitosin uygulamasının klinik olarak önemli bir rol üstleneceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Deneysel diyabet, mikroskopi, oksitosin, sıçan, testis.

2. SUMMARY

The Effect of Exogenous Oxytocin on Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Adult Rat Testes

The aim of this study is to investigate the therapeutic and protective effects of oxytocin treatment on testicular tissue of diabetic rats, induced by streptozotocin (STZ), before and after onset of experimental diabetes. Wistar Albino rats were divided into four groups: 1) Control group (n:6): 0,3 ml saline solution was injected intraperitoneally (i.p.), 2) STZ group (n:6): single dose STZ (65 mg/kg) was injected ip for 4 weeks, 3) Pre Oxytocin group (n:6): 5 µg/kg of oxytocin was injected i.p. for 5 days interval before single dose of STZ injection for 4 weeks, 4) Post Oxytocin group (n:6): 5 µg/kg oxytocin was injected i.p. for 5 days interval following single dose of STZ injection for 4 weeks. Blood samples were obtained and measured by a glucometer at the beginning of experiment and once a week during the whole experiment. The diabetic rats whose blood glucose levels were more than 200 mg/dl were included to the experiment. Following sacrifice at the end of the 4th week, testis tissue samples were taken to be processed for light and transmission electron microscopy. Blood samples were processed for malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) measurements. Testicular paraffin sections were stained with Haematoxylin and Eosin (H&E) and Periodic acid-Schiff (PAS) reaction and evaluated by light microscopy. It was revealed that oxytocin treatment decreased the testicular damage which was more prominent in STZ group. Histopathological damage especially has been reduced in pre-oxytocin group compared to the post oxytocin group. According to biochemical data, MDA and AOPP levels were reduced, whereas GSH level was increased in oxytocin treated groups when compared to STZ group. As a result, we can conclude that oxytocin has a protective effects on STZ- induced diabetic rat testes. To conclude, we suggest that oxytocin might have an important role in protection of testicular tissue from diabetes.

Keywords: Experimental diabetes, microscopy, oxytocin, rat, testes.

3. GİRİŞ VE AMAÇ:

Dünyada 300 milyon civarında diyabet hastası bulunmaktadır. Bu sayının yanlış beslenme alışkanlıklarına ve obezite oranına bağlı olarak hızla artması beklenmektedir. Önümüzdeki yıllarda toplumda önemli bir sağlık sorunu haline gelebilecek olan diyabet, üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biridir (WHO,FactSheetNo.312.Ağustos2011,<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, Erişim tarihi: 15 Mayıs 2012).

Diyabet, infertiliteye sebep olabilen önemli etkenlerden biri olup testis ağırlığının azalması ile birlikte germinal epitel hücrelerinde harabiyete, seminifer tübüllerde atrofi ile birlikte interstisyel doku artışına neden olmaktadır. Ayrıca diyabetin bu bulgulara paralel olarak sperm sayısında ve hareketliliğinde azalmaya da neden olduğu gösterilmiştir (Ricci et al 2009).

Streptozotosin (STZ) deneysel diyabet oluşturmak için en çok kullanılan maddelerden biridir. STZ, kimyasal formülü 2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoreido-D-Glukopiranoz), olan *streptomyce griseusun* metabolitidir. Yapısında glukoz molekülü içerdiği için plazma membranındaki glukoreseptörlere bağlanan STZ, glukozla uyarılan insülin salınımını bloke eder. Kan insülin ve glukoz seviyelerindeki değişiklikler sonrası pankreastaki p hücrelerinde geri dönüşümlü hasara neden olmaktadır. STZ'nin pankreas P hücrelerinde yarattığı hasar sonucu gelişen hipoinsülinemi, hiperglisemi ve doku hasarı Tip I diyabet hasar modelini yansıtmaktadır. Yapılan çalışmalar sırasında STZ'nin uygulanmasından 4 ila 8 hafta sonra diyabet oluştuğunu göstermektedir (Szkudelski 2001, Öztürk, Gül, Ağkadir ve Yağmurca 2002, Tang et al 2008, Tunçdemir 2006).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, diyabete bağlı olarak gelişen testis hasarının önlenmesinde vitamin E, vitamin C, L-karnitin, alfa lipoik asit, melatonin, leptin ve oksitosin gibi antioksidanların etkileri gösterilmiştir (Caprio et al 2003, Frayne, Townsend and Nicholson 1996, Mohasseb, Ebied, Yehia, Hussein 2011).

Hipotalamusta sentezlenen bir hormon olan oksitosinin üreme sistemi üzerindeki iyileştirici etkileri bilinmektedir. Oksitosinin üreme sistemi ile ilişkilendirilmesi pek çok çalışmada işlenmiş olmasına rağmen STZ ile oluşturulan diyabet sonrası ve öncesi oksitosin uygulamasının koruyucu ve iyileştirici etkisini inceleyen çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır (Frayne, Townsend and Nicholson 1996).

Özellikle deneysel çalışmalarda biyokimyasal olarak oksidatif stres hasarını göstermeye yönelik kullanılan malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP, Advanced Oxidation Protein Products) çalışmada oksitosinin antioksidan etkisini açıklamada etkin rol oynayacağı düşünülmektedir. Çeşitli testis hasar modeli çalışmalarında antioksidan etki araştırılmak için biyokimyasal olarak MDA, GSH ve AOPP gibi parametrelere bakılmıştır (Söylemez et al 2011, Mahaneem, Siti Amrah, Hasnan and Kuttulebbai2011).

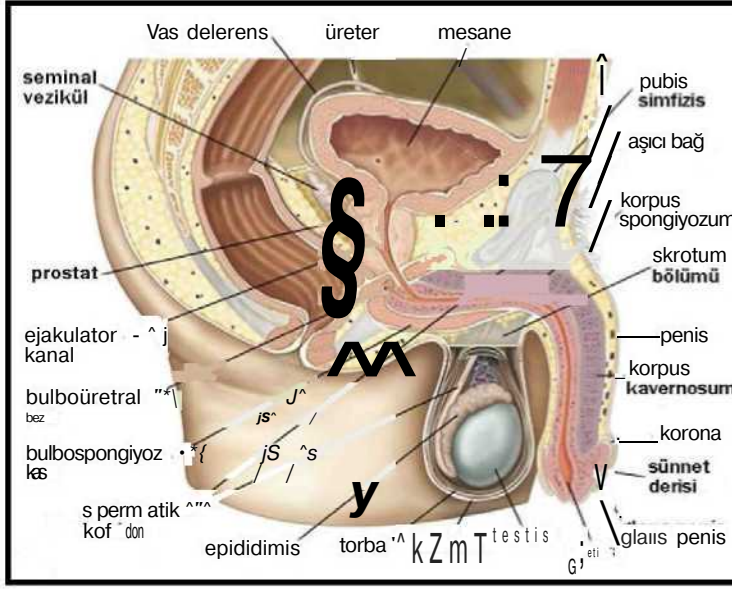
Bu çalışmada, STZ ile oluşturulan deneysel diyabete bağlı olarak gelişen testis dokusu harabiyeti üzerine oksitosinin tedavi edici ve koruyucu etkilerinin boyutlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan deneyler sonrasında, testis morfolojisindeki histopatolojik değişiklikler ışık ve geçirimli elektron mikroskopisi düzeyinde incelenmiştir. Diyabet oluşumunun kontrolü için kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Dokuda oluşan oksidatif hasarı biyokimyasal düzeyde belirlemeye yönelik olarak serumda MDA, GSH ve AOPP ölçümü yapılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

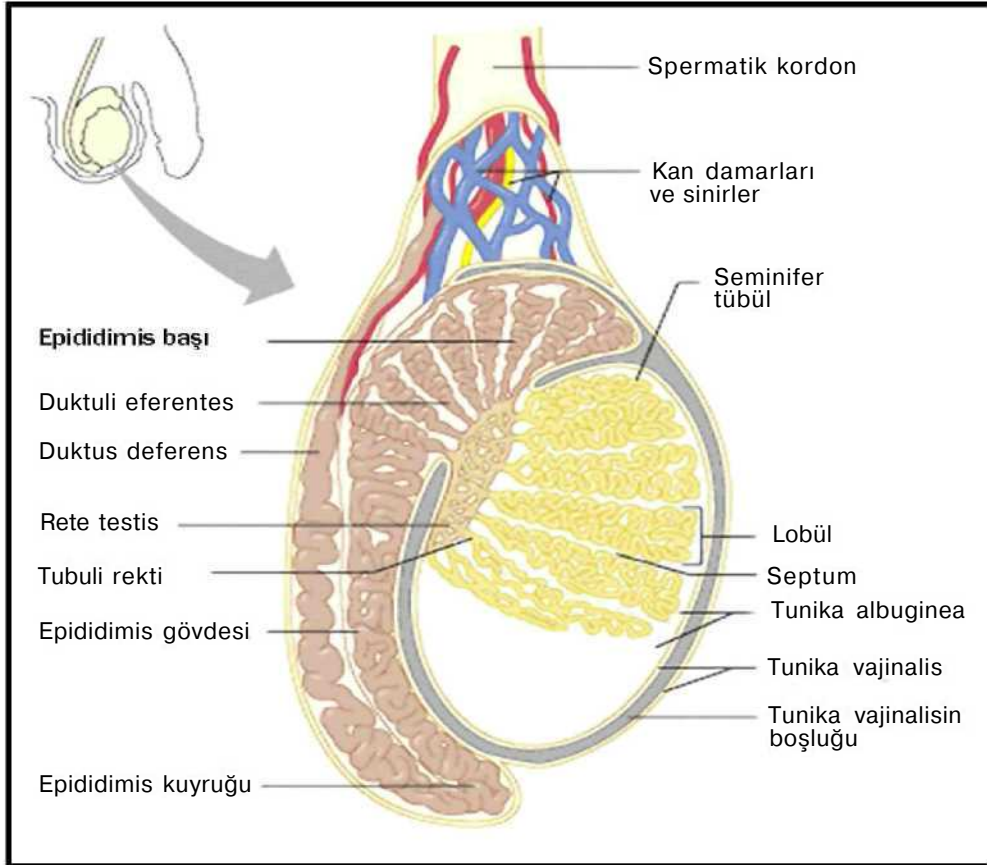
4.1. Testis Histolojisi:

Testisin başlıca görevi hormon ve spermatazoon üretmektir. Üretilen hormonlardan testosteron; spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir.

Testisler erkek üreme hücrelerinin üretildiği, skrotum denilen kesede yerleşmiş bir çift organdır (Şekil 1). Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişmeye başlarlar. Daha sonra skrotuma inerlerken, peritonun bir kısmını da birlikte sürüklerler. Bu periton kesesi daha sonra Tunika vaginalise dönüşür ve testisin anterolateral bölgesini örten seröz bir kese yaparak organın skrotum içinde hareketli olmasını sağlar. Testis, düzensiz sıkı bağ dokusu kapsülü Tunika albuginea ile sarıdır. Bu bağ dokunun altında damardan zengin bir yapı olan Tunika vaskulosa yer alır. Tunika albugineanın posterior kısmı kalınlaşarak Mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten ayrılan bağ dokusu bölmeleri testisi piramit biçimli, yaklaşık 250 adet lobüle ayırır. Lobüllerin içinde 1-4 arasında seminifer tübül denilen oldukça kıvrıntılı borular bulunmaktadır. Lobüllerin apeksinde seminifer tübüller tübülü rektiye açılır. Tübülü rekti seminifer tübülleri rete testise bağlayan düz kanallar sistemidir. Rete testis mediastinumda bulunan pleksusa benzer yapıda epitel ile örtülü bir kanallar sistemidir (Şekil 2). Seminifer tübüllerde oluşan spermatozoonlar, tübülü rekti yoluyla önce rete testise, daha sonra sayıları 10-20 arasında değişen duktuli eferenslere ulaşırlar ve epididimise geçerler. Olgun testisin arka yüzü ile epididimis ilişki içerisindedir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır (Junqueira ve Carneiro 2006).



Şekil 1: Erkek genital sistemi (Marieb 2001).



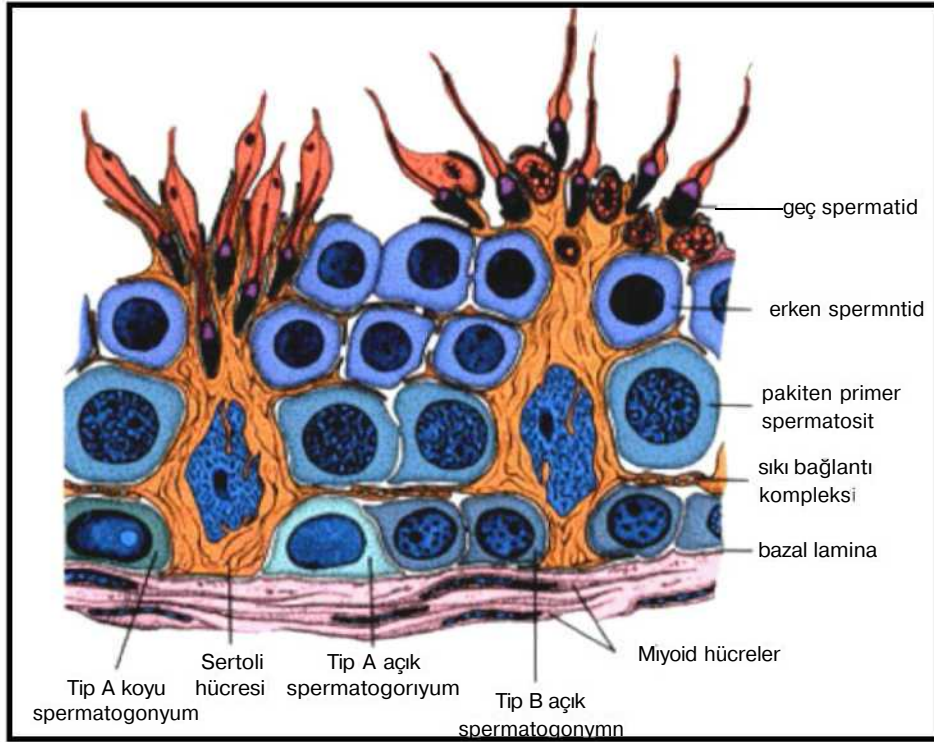
Şekil 2: Testisin yapısı. Testise giren kan damarları ve sinirler ile birlikte epididimis ve seminifer tübüller görülmektedir (Marieb 2001).

4.1.1.Seminifer túbüller

Seminifer túbüller yaklaşık 30-70 cm uzunluğunda, 150-250 mikrometre çapında kıvrıntılı túbüllerdir. Seminifer túbüller belirgin bir bazal membran üzerine oturmuşlardır ve aralarında gevşek bağ dokusu bulunur. Bu bağ dokusuna peritúbüler doku ya da lamina propria denir. Bu bağ dokusunda kan damarları, lenfatik kanallar veya sinuzoidler, makrofajlar ve Leydig hücre grupları bulunur. Androjen üreten Leydig hücreleri kan damarlarına yakın yerleşmiştir ve testisin temel endokrin hücre gruplarını oluşturur.

Seminifer epitel, çok sıralı bir epitel olup iki temel hücre tipi içerir (Şekil 3):

1. Destek hücreleri (Sertoli hücreleri)
2. Gelişmekte olan erkek germ hücreleri (spermatogonik hücreler)



Şekil 3: Seminifer epitelin bir bölümü. Seminifer epitel 2 tip hücreden oluşmuştur: Spermatogonik seri hücreleri ve Sertoli hücreleri (Contuk 2009).

Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ve tübül lümeni arasında dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılabilir; spermatositogenez olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatogonyumların ardı ardına iki bölünmesi sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin olduğu evre mayoz adını alır. Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır. Spermatositogenez (spermatogenez); bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler. İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu renkli boyananlar koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyum kök hücre rezervi olarak görev alır. Tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur. İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür. Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur, her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden

seminifer túbüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitelyum siklusu germinal epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşın matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter. Seminifer túbüllerde bulunan bir diğer hücre de Sertoli hücreleridir. Embriyonik yaşın sırasında, primordial diđi kanal sisteminin gerilemesine neden olan Mülleriian inhibiting faktörü salgılar. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer túbülün lümenine uzanır. Işıık mikroskobunda, Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışınalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar kaba endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nukleusta çok sayıda kıvrılmalar, belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin görülür. Bitişik Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Sertoli hücreleri sıkı bağlantılar (tight junction) denilen birleşmelerle, hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır.

Sertoli hücrelerinin en az dört önemli fonksiyonu vardır:

1. Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi
2. Fagositoz: Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosome edilir ve sindirilir.

3. Sekresyon: Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından Foliküler stimulan hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.

4. Anti-Müllerian Hormon üretimi: Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallardan köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenez seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler. Testisin seminifer tübülleri arasındaki interstisyel doku da bağ dokusu, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla dolu bulunur. Testiküler kapiler pencereci tiptedir ve böylece kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade eder. İntertisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının birleşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir. Bunlar arasında fibroblast, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir çekirdeği ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir.

Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası iş birliğine bir örnek oluşturur. Leydig

hücrelerinin hem aktiviteleri hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 18. haftasına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan lüteinizan hormonlarının (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (Janguerial, Carneiro, Kelley 1998).

4.1.2. Testisin histofizyolojisi

Vücut içi sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regulasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35 °C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (*pampiniform pleksus*) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, FSH ve LH'nin testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'nin ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve testosteronu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir ortam olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir (Ross, Romrell 2006).

4.1.3.Kan-testis bariyeri ve sıkı bağlantılar

Spermatogonyumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı teşvik edebilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır. Bu bariyer seminifer tübüllere immünglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeyde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilité bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir oto immün reaksiyondan korumuş olur. Kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması, sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklayan bir olgudur. Testisteki kapiler pencere tiptedir ve büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verir. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (tight junction) bu bariyerden sorumludurlar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli rol oynarlar.

Seminifer epiteldeki sıkı bağlantılar, membrana en yakın konumdaki lokalizasyonu ile diğer sıkı bağlantılardan farklıdır. Sıkı bağlantılar, bazal laminanın yanındaki seminifer epitelyumun bazal kompartmanındaki Sertoli hücreleri arasında bulunur. Seminifer tübüldeki sıkı bağlantılar seminifer epitelin bazaline yakın bulunan Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla oluşur. Bu sıkı bağlantılar seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olarak iki bölüme ayırır. Bazal bölümde spermatogonyumlar ve preleptoten spermatositler bulunurken adluminal bölümde diğer germ hücreleri bulunur. Testisteki sıkı bağlantı bölgesinde periferal membran proteinler dizisi ve 3 farklı sıkı bağlantı integral membran proteinlerinden oluşur. Bunlar; zonula okludens çeşitleri olan, zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2), okludin, klauudin gibi sıkı bağlantı proteinleridir. Sıkı bağlantıların en yüzeyde olanı zonula okludenstir. Ağa benzer bir yapı oluşturacak şekilde katlanma ve kıvrılmalar gösterir. Kabartı

ve olukların sayısı ve kaynaşma yerleri epitelyumun sıvı alışverişi ile çok yakından ilgilidir. Sıkı bağlantının esas fonksiyonu oldukça sıkı bir tutunma meydana getirmek böylece epitelyum hücreleri arasından her iki yöne doğru madde geçişini engellemektir. Bazı epitellerde elektriksel potansiyeller epitelin molekül transport yeteneğini etkileyerek moleküllerin epitelden geçişini düzenler (Erkanlı 2008).

4.2. Diyabet

Diabetes mellitus (DM), insülin salgılanması ya da insülinin etkisindeki tam veya kısmi yetersizlikle ilişkili olarak ortaya çıkan kronik hiperglisemi; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ve bu bozuklukları takiben ileri dönemde ortaya çıkan çeşitli komplikasyonlarla (anjiyopati, kardiyomiyopati, nöropati, nefropati veretinoz gibi) karakterize bir sendromdur. Bu hastalık çok eski yıllardan beri bilinmesine rağmen, idrarda şekerin bulunduğu ancak 18. yüzyılda Dopson tarafından saptanmış ve bu hastalığın pankreasla olan ilişkisi 1889 yılında Mering ve Minkowski'nin pankreatektomi yapılmış köpeklerde diyabet oluştuğunu gözlemlenmesi ile anlaşılmıştır. 1921 yılında Banthing ve Best'in, insülini pankreastan ekstrakte etmeleri sonucunda P hücresi ile olan ilişkisi ortaya çıkmıştır (Avcı 2001).

4.2.1. Diabetes mellitusun tipleri ve klinik özellikleri:

World Health Organisation (WHO)'a göre glisemi bozuklukları etiyolojilerine göre, 1999 yılında diyabet sınıflamasındaki ayrılıkları önlemek amacıyla geçerli bir sınıflamayı kabul etmiştir. DM'un klinik sınıflaması aşağıda açıklanmıştır:

Tip I diyabet (İnsüline bağımlı diyabet-1DDM): P hücre yıkımı (T lenfositlerin aktivasyonu ile), insülin sekresyonunun yokluğu ya da çok düşük oluşu, glukagon gibi uyarılara C-peptid yanıtının alınamayışı genellikle tam insülin yetmezliğine yol açar. "Jüvenil diyabet", "genç tipi şeker hastalığı" veya "ketoza elverişli şekerli diyabet" adları ile anılan bu hastalık, "insüline bağımlı"

ya da "tip 1 diyabet" olarak isimlendirilir. Erken yaşlarda başlar (11-13 yaş) ve hastalar kısa sürede hızla kilo verirler. Tip I DM'in toplumdaki sıklığı %10-15 dir.

Tip II diyabet (İnsüline bağımlı olmayan diyabet-NIDDM): İnsülinin periferik etkisinde ve insülinin pankreas P hücrelerinden salgılanışında bozukluklarla seyreden ve toplumda sık rastlanan DM tipidir. İnsüline bağımlı olmayan (NIDDM) veya erişkin tipi diabet olarak isimlendirilir. Bu tip diyabetin obezite ve kalıtımla ilişkili olduğu bilinmektedir. Tip II diyabete orta ve ileri yaş erişkinlerde daha sık rastlanır ve genellikle bireyler şişmandır. Tüm diyabet vakalarının % 80'ini oluşturan Tip II diyabet'in toplumdaki sıklığı % 2-5 arasındadır.

Malnutrisyon diyabeti: Beslenme ile ilgili ve pankreasda kalsifikasyon ve organik bozukluklara bağlı olarak gelişen, diyet dışında bir tedavi gerektirmeyen, insülin sekresyonunun var olduğu bir DM tipidir.

Gebelik diyabeti (Gestasyonel diyabet): Gebelik esnasında başlayan ve ilk defa gebelik esnasında tanınan değişik derecelerdeki karbohidrat intoleransı için kullanılan bir tanıdır. Artmış insülin direnci, insülin yapımının yetersizliği ve bu iki defektin birleşimi sonucu gestasyonel diyabet oluşur.

Diğer tip diyabetler: Pankreatit, Cushing sendromu veya akromegali seyrinde ortaya çıkan genetik bazı sendromlarla veya insülin reseptör anomalileri ile ortaya çıkan diyabet tipleridir. Bunlar arasında; P hücre fonksiyonunda genetik kusurlar, insülin etkisi ile ilgili genetik kusurlar, endokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç ve kimyasallara bağlı diyabet, enfeksiyonlar, immünite aracılı diyabetin nadir formları, diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar sayılabilir (Tunçdemir 2006).

4.2.2. Diyabet oluşumuna etki eden faktörler

- a. Genetik sendromlar (Tip A ve Tip B insülin direnç sendromları, glikojen depo hastalığı, Wolfram sendromu, Down, Klinefelter ve Turner sendromları).
- b. Endokrin hastalıkları (Akromegali, Cushing sendromu, Glukagonoma, hipertiroidi, hiperparatiroidi, Pankreatik kolera sendromu, büyüme hormonu yetersizliği).
- c. Pankreatik hastalıklar (Pankreatektomi, pankreatit, hemokromatozis).
- d. İlaçlar, kimyasal ajanlar, toksinler (Tiyazid grubu diüretikler, beta adrenejik reseptör blokerleri, glukokortikosteroidler, psikoaktif ajanlar, antineoplastik ajanlar, katyonlar) (Tunçdemir 2006).

4.3. Deneysel Diyabet Modelleri

Farklı kimyasal ajanlar diyabet koşullarını oluşturabilirler. Bunlardan streptozotosin (STZ) ve alloksan en çok kullanılanlardır. STZ ve alloksan, beta hücrelerini seçici olarak tahrip etmektedir.

Alloksan, kimyasal formülü 2, 4, 5, 6 Tetraokzoheksahidropirimidin olan, ürik asit türevi, antineoplastik bir ajandır. Genellikle monohidrat tuzu şeklinde bulunur. Glukozla uyarılan insülin salınımını inhibe eder; yüksek dozları beta hücre nekrozu yapar. Fakat STZ daha spesifik beta hücre sitotoksitesine sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. STZ ve alloksanın yüksek dozları tip 1 diyabete neden olurken; daha düşük dozları beta hücre kitlesinin kısmen azalmasına sebep olur.

Alloksan ile STZ arasındaki farklar düşünüldüğünde:

- STZ'ye kıyasla alloksan ile daha yüksek kan şekeri düzeyleri saptanır.
- STZ ve alloksan ile kan şekeri düzeyinde üç fazlı bir etki oluşur.

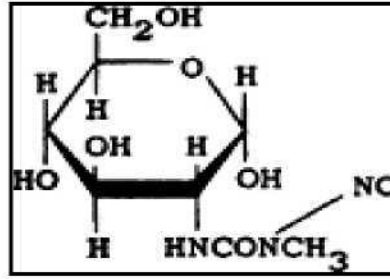
Birinci faz geçici hiperglisemi fazı, ikinci faz şiddetli hipoglisemi ve üçüncü faz da kalıcı hiperglisemi fazıdır. STZ' ye bağlı gelişen üçüncü faz, alloksana oranla genellikle 1 saat daha geç ortaya çıkar.

- Alloksan ile ketozis daha sık oluşur.
- STZ diyabetinde nöropati daha fazladır (İrer, Alper 2004).

4.3.1. Streptozotosin (STZ):

Farklı kimyasal ajanlar diyabet koşullarını oluşturabilirler. Bunlardan STZ en çok kullanılandır.

STZ nitrosourea türevidir ve ilk olarak 1959 yılında *Streptomyces achromogenes*'den izole edilmiştir. STZ onkolitik, onkojenik ve diabetojenik özelliği olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Moleküler ağırlığı 457 daltondur. STZ'nin diabetojenik etkisi ilk kez 1963 yılında Rakieten tarafından saptanmış ve daha sonraları deneysel diyabet çalışmalarında kullanılmıştır (Bolzan 2002).



Şekil 4: Streptozotosin'in moleküler yapısı (Bolzan 2002).

STZ glukoz oksidasyonunu bozarak insülin biyosentezini ve salınımını azaltır. STZ, pankreatik P hücreleri tarafından glukoz taşıyıcısı (GLUT2) aracılığıyla metabolizmaya alınmaktadır. GLUT2'nin ekspresyonunun azalmasının, STZ'nin diabetojenik etkisini önlediği saptanmıştır. STZ, ilk olarak P hücrelerinin glukoz cevabını kaybetmesine neden olmaktadır. STZ'nin hücre içinde pankreatik p hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir. STZ ile oluşturulan diyabette, P hücrelerinin ölümüne sebep olan temel neden DNA alkilasyonudur. STZ'nin alkilasyon etkisi, nitrozoürelere fonksiyonel grubuyla özellikle Guaninin O⁶ pozisyonuyla ilişkilidir. Sıçanlara uygulanan STZ enjeksiyonundan sonra, dokularda farklı metilasyon aşamasında purinler bulunmaktadır. Ayrıca, STZ'nin, nitrik oksiti (NO) de tetikleyici etkisi olduğu saptanmıştır. NO'nin pankreatik adacık hücresi olan P hücre grubunu harap ettiği gösterilmiştir (Szkudelski 2001).

4.3.2. Streptozotosin ve erkek üreme sistemi

STZ uygulaması testis dokusu açısından incelendiğinde; diyabetik sıçanlarda oksidatif strese ve akabinde testiste seminifer tübül germinal epitelindeki spermatogenik hücrelerde oluşan dejenerasyon sonrası sperm sayısı ve hareketliliğinde azalmaya neden olmaktadır. Bu durum da infertiliteye yol açmaktadır. Hormonal açıdan incelendiğinde, STZ uygulamasının erkek sıçanlarda vücut ağırlığı ve testis ağırlığında azalmaya paralel olarak testosteron seviyesinde azalmaya da neden olduğu belirlenmiştir (Koh 2007).

STZ uygulamasının testiste apoptotik hücre sayısını arttırdığı ve diyabet oluşumu sonrası Leydig hücrelerinin proliferasyonunda azalma olduğu bilinmektedir (Ricci et al 2009).

Diyabetik bireylerde olgunlaşmamış ve apoptoza giden, az hareketli, anormal akrozom içeren ve morfolojik açıdan hasarlı sperm yüzdesi oldukça yüksektir (Baccetti et al 2002).

Sülfürlü mineral suyu ve sodyum hidrosülfid gibi sülfür tabanlı tedavi ajanlarının STZ ile oluşturulan diyabette testiküler apoptozisde etkili olduğu ve etki mekanizmasının apoptoz düzenleyici regülatör proteinler yani Bcl-2, Bax, P53 gibi genetik ekspresyonlar üzerinden etkin olduğu gösterilmiştir (Sadik, El-Seweidy, Shaker2011).

4.3.3. Diyabet ve oksidatif stres

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol

oyunlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır.

Diyabette serbest radikallerin arttığı ve/veya antioksidan mekanizmaların inhibe olduğu oksidatif stres durumlarından birisidir. Protein glikasyonu ve glikoz oto-oksidasyonu, lipid peroksidasyonuna neden olabilen serbest radikalleri oluşturmaktadır. Oksidatif stresin diğer potansiyel mekanizmaları arasında antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği bulunmaktadır. Antioksidanlar, diyabette bozulan oksidatif stres mekanizmasının, protein glikasyonunun ve glukoz metabolizmasının düzeltilmesinde önemli etkiler oluşturmaktadır (Altan, Dinçel ve Koca 2006).

4.3.4. Oksidatif stres ve antioksidan ilişkisi

Oksidatif stres serbest radikallerin yol açtığı ve hücrelere fiziksel hasar veren bir süreçtir. Vücutta serbest radikaller oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu sürekli olarak oluşur. Oksidatif stres, hücresel antioksidan sistemi oluşturan süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidanları tarafından giderilir. Organizmada pek çok türde reaktif oksijen parçacığı oluşabilir, bunlar en sık lipid yapılarda gözlenir. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere dönüşebilir. Malondialdehit, enzimatik olmayan yolla oksidatif lipid peroksidlerin parçalanması sonucu oluşan aldehit grubundan olan toksik etkili bir radikaldir. MDA, proteinlerin amino gruplarına,

fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (Ohkawa, Ohishi and Yagi 1979).

İleri oksidasyon protein ürünleri, (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) Oksidatif stres belirteçidir. Oksidasyon aracılı protein hasarını gösterir. Protein oksidasyonunun yeni bir belirteci olan AOPP ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmıştır (Witko-Sarsat et al 1996).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve sabitleştirme yeteneğine sahip maddelere "antioksidan" adı verilir. Antioksidan moleküller, oluşan oksidasyonun farklı noktalarında etkilerini gösterirler.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastına etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler

Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar: 1) SOD, 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST), 4) CAT, 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, 6) Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar: 1) Melatonin, 2) Oksitosin, 3) Seruloplazmin, 4) Transferrin, 5) Miyogloblin, 6) Hemoglobin, 7) Ferritin, 8) Bilirubin, 9) Glutatyon, 10) Sistein, 11) Metiyonin, 12) Ürat, 13) Laktoferrin, 14) Albümin.

Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

Vitamin olan eksojen antioksidanlar: 1) a-tokoferol (vitamin E), 2) Askorbik asit, 3) Folik asit, 4) Beta karoten (Koca, Karadeniz 2003).

Antioksidan etki oluşturan maddeler:

Melatonin: En zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini (OH \cdot) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (Guneli et al 2008).

Alfa lipoik asit: Bitkiler, hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenebilen doğal bir bileşiktir. Enzim kofaktörü (Glukoz, karbonhidrat, yağ asidi protein ve aminoasit metabolizmasında) olarak da görev yapar. En güçlü yaşlanma karşıtı antioksidanlardan ve anti- inflamatuarlardan biridir (Azza, Mohamed, Khaled, Aml 2012).

Glutatyon: Glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olup antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan glutatyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli role sahiptir. GSH, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini de engeller. Proteinlerdeki -SH gruplarının redükte halde kalmasını sağlar ve bu grupları oksidasyona karşı korur (Kalra, Chaudhary and Prasad 1991).

4.4. Oksitosin:

Hipotalamusta sentezlenen oksitosin, düz kasların özellikle de uterus düz kaslarının kasılmasına neden olan bir hormondur. Antioksidan özelliğiyle de bilinen oksitosin, doku hasarını önleyerek etkisini gösteren bir peptittir. Oksitosin, moleküler olarak 6 aminoasitlik bir halkasal yapı ve 3 aminoasitlik yan zincirden oluşur (Hideki and Kaneko 2002). Gebelik ve laktasyon esnasında meme bezinde bulunan miyoepitelial hücrelerde oksitosin reseptörünün ekspresyonu artar. Salgılanan oksitosin meme bezlerinin asinuslarını saran miyoepitelial hücrelerin kasılmasına neden olur ve bunun sonucu memeden süt salınımını sağlar. Buna karşın doğumun başlaması ve devam etmesinde oksitosinin rolü tam olarak anlaşılmış değildir. Oksitosine uterusun duyarlılığı gebelikte artmaktadır. Oksitosinle oluşan uterus kasılması [3-adrenerjik agonistleri, magnezyum sülfat ya da inhalasyon anestetikleriyle inhibe edilebilmektedir (Lee, Macbeth, Pagani and Scott 2009). Son yıllarda, oksitosin reseptör geninin hipofiz, böbrek, yumurtalık, testis, timus, kalp, vasküler endotel, adiposit ve birçok tip kanser hücresi gibi birçok farklı yerde ekspresyon edilmesinin bulunuşu, klasik oksitosin anlayışında da gelişmelere sebep olmuştur (Gimpl and Fahrenholz 2001)

4.4.1. Oksitosinin erkek üreme sistemi ve diğer sistemler üzerine etkileri

Oksitosin erkek hayvanlarda üreme üzerine hem spermatozoon sayısını hem de üreme hormonlarının düzeyini değiştirerek etki etmektedir. Sıçan testisine implant tarzında uzun süreli oksitosin uygulaması testosteron ve FSH düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olurken dihidrotestosteron düzeyinde ise belirgin bir artış sağlamaktadır (Nicholsan, Guldenaar, Boer and Pickering 1991). Ayrıca yapılan çalışmalarda oksitosinin erkek genital organlarında koruyucu etkisi olduğu da gösterilmiştir (Thackare, Nicholson and Whittington 2006). Puberte dönemindeki erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada, oksitosinin testisten epididimise geçen spermatozoonların transferini arttırıcı yönde olumlu

bir etkisi olduğu ve ejakulattaki sperm miktarını da arttırdığı belirtilmiştir (Frayne, Townsend and Nicholson 1996). Oksitosin, sıçanlarda seminifer túbül, epididimis ve prostat bezinin kasılmasını uyarak, parakrin bir görev üstlenmektedir. Oksitosin, birçok organda olduğu gibi, testislerde de mitotik aktiviteyi uyarmaktadır. Oksitosinin, testiste spermatogenik hücrelerde mitotik aktiviteyi arttırarak oligospermi vakalarında tedavi edici etkisinin olduğu düşünölmektedir (Thackare, Nicholson and Whittington 2006).

Oksitosinin dişi ve erkek sıçanlarda antistres etkili olduğu, yara iyileşmesini hızlandırdığı, kilo alımını uyardığı ve endojen etkiyi arttırdığı bildirilmiştir (Kovacs, Sarnyai and Szabo 1998, Uvnas-Moberg 1998) .

Oksitosin sistemik uygulandığında gastrointestinal motiliteyi ve düz kas kontraktilesini değiştirdiği ve deneysel mide ve duodenum ülserlerinde antisekretuar ve antiülser etkili olduğu gösterilmiştir (Duridanova, Nedelcheva and Gagov1997, Monstein, Grahn, Truedsson and Ohlsson 2004).

5. GEREÇ VE YÖNTEM:

Deneysel çalışma öncesi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (20.11.2011- 55. 2001.mar). Ağırlıkları 200 -300 gr arasında değişen, standart koşullarda yetiştirilen 24 adet erişkin erkek *Wistar albino* sıçan Marmara Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER) temin edildi. Sıçanlar deney süresince bazal diyet ile beslendiler. Deney hayvanlarının bulunduğu ortamda $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda ısısı, % 60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat süresince karanlık ritim sağlandı. Deneye başlamadan önce deney gruplarında yer alan tüm sıçanların ağırlıkları tartıldı ve kan glukoz değerleri belirlendi. Kan örnekleri sıçanların kuyruk venlerinden insülin enjektörü ile alındı.

STZ grubuna 1 mi + 4°C 'deki serum fizyolojik içinde çözündürülmüş, 65 mg/kg STZ intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. STZ enjeksiyonu sonrası 72. saatte alınan açlık venöz kan örnekleri glukometre ve glukoz stripi aracılığıyla ölçülüp, glukoz değerleri 200 mg/L ve üzeri olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edildi. Bu değer in altında olan hayvanlar deneye alınmadı.

Tüm deney gruplarındaki sıçanlardan ilgili deney sürelerinin bitiminde eter anestezisi altında kan örnekleri alınmış olup, sakrifikasyon sonrası, sağ ve sol testis dokuları çıkartılarak testisler ayrı ayrı tartılmıştır. Sağ testis dokuları geçirimli elektron mikroskopi, sol testis doku örnekleri ise ışık mikroskopi incelemeleri için kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan gruplar ve uygulamalar aşağıda belirtildiği şekildedir (Tablo 1):

1) Kontrol Grubu (n: 6): 0,3 ml serum fizyolojik solüsyonu diyabet oluşturulmamış sıçanlara tek doz, 5 gün boyunca i.p. olarak aynı saatte uygulandı. Bu işlemi takibeden 24 saatin bitiminde sıçanlar eter anestezisiyle sakrifiye edilerek kan ve testis doku örnekleri alındı.

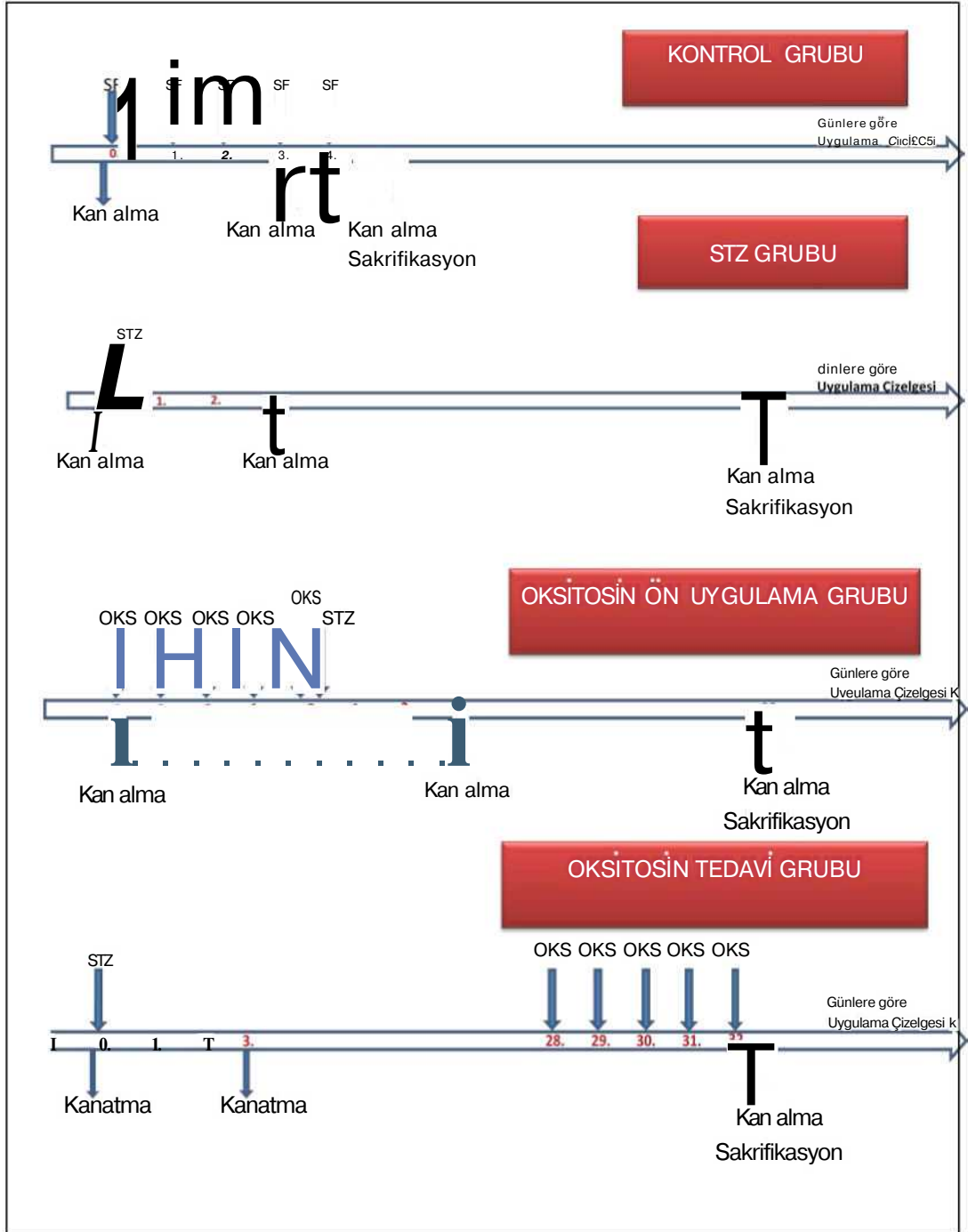
2) STZ Grubu (n: 6): Sıçanlara 65 mg/kg STZ sadece tek bir kez i.p. olarak uygulandı. Bu işlemi takiben 4 hafta sonra sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek kan ve testis doku örnekleri alındı.

3) Oksitosin ön uygulama Grubu (n: 6): Sıçanlara 5 µg/kg oksitosin tek doz, 5 gün boyunca her gün i.p. olarak aynı saatte uygulandıktan sonra son uygulamayı takibeden 24 saatin bitiminde 65 mg/kg STZ bir kez tek doz i.p. olarak uygulandı. Bu işlemi takiben 4 hafta sonra sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek kan ve testis doku örnekleri alındı.

4) Oksitosin tedavi Grubu (n: 6): Sıçanlara 65 mg/kg STZ sadece bir defa i.p. olarak uygulandıktan 4 hafta sonra 5 µg/kg oksitosin tek doz olarak, 5 gün boyunca her gün aynı saatte i.p. olarak uygulandı. Bu işlemi takibeden 24 saatin bitiminde sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek kan ve testis doku örnekleri alındı.

Tüm gruplardaki hayvanların kuyruk venlerinden alınan kan örnekleri; deney başlangıcından hemen önce, STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra ve sakrifikasyondan hemen önce alınmıştır (Tablo 1).

Tablo: Deney gımlanna ait enjeksiyon zaman çizelgesini gösteren tablo.





Resim 1: Erkek sıçanların kalbinden kan alınması ve sakrifikasyon aşamasının fotoğrafı.

5.1. Histopatolojik Preparasyon

5.1.1. Işık mikroskopisi metodu

Deney gruplarından alınan testis doku örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalin fiksatifine alınarak 4 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra örnekler yarı otomatik doku takip cihazı ile (Leica Tp 1020, Almanya) yükselen etil alkol serisi (%70, %90, %96, %100) ve ksilenle saydamlaştırma aşamasından geçirildi. Işık mikroskopisi preparasyon yöntemleri kullanılarak testis dokuları gömme kabininde (Leica EG 1150H, Almanya) parafine gömüldü. Blokların soğuk zeminde (cold plate- Leica EG 1150C, Almanya) hızlıca soğutulup, donmaları sağlandı. Mikrotom (Leica RM2125RT, Almanya) ile 5 um kalınlığında alınan parafin testis dokusu kesitleri sıcak su banyosuna (Leica HI 1210, Almanya) aktarıldı. Daha sonra testis doku bloklarından elde edilen kesitler histolojik boyamalar için lamlara alındı.

Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyama protokolü:

Testis doku bloklarından alınan kesitler etüvde (Nüve FN 400, Türkiye) 65°C'de 60 dakika tutulduktan sonra 3 defa 5'er dakika ksilenden geçirilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Azalan konsantrasyondaki etil alkol serisi ile hidrasyon (%96 alkol 5 dakika, %80 alkol 5 dakika, %70 alkol 5 dakika) gerçekleştirildi. Kesitler, hematoxilede 5 dakika tutulduktan sonra bir defa sudan geçirilip diferansiyasyon için asit alkolde 1 dakika bekletildi. Mavileştirme doymuş lityum karbonat ile sağlandı. Kesitler eozinde 1 dakika tutularak sitoplazma boyaması sağlandı. Testis doku örneklerinden alınan kesitler eosinle boyandıktan sonra dehidrasyon (%70, %80, %96 ve %100 etil alkol) yükselen konsantrasyondaki etil alkol serisi ile sağlandı. Berraklaştırma için kesitler ksilende 2 defa 5 dakika tutuldu. Bu işlemleri takiben, kesitler sulu olmayan kapama (Thermo Scientific Shandon Consul - Mount Ref.9990440, ABD) maddesi kullanılarak uygun lamel ile kapatıldı.

Periyodik Asit -Schiff (PAS) reaksiyonu:

Seminifer tübüllerin bazal membran yapısını göstermek amacıyla PAS reaksiyonu aşağıdaki işlem sırasına göre uygulandı.

- Periyodik Asit Çözeltisi:

100 ml distile suda 1 gr periyodik asit çözülerek elde edildi.

- Schiff Çözeltisi:

200 ml kaynayan distile suda 1 gr bazik fuksin çözdürüldü. Karışımın ısı 50°C'ye düştüğünde 2 gr potasyum metabisülfite eklenerek çözüldürüldü. Çözeltinin ısı oda ısısına düştüğünde 2 ml HCl ve 2 gr aktif karbon eklenip, karıştırıldı. Hazırlanan çözelti 1 gece boyunca oda ısısında karanlıkta ağzı kapalı bir şekilde bekletildi. Berrak ya da açık sarı renkli çözelti ertesi gün filtre kâğıdından süzüldü. Elde edilen çözelti +4°C'de saklandı.

- Mayer'in Hematoksilen boyama protokolü:

Hücrelerdeki nukleusları göstermek amacıyla Mayer'in Hematoksileni ile boyama yapıldı. Hematoksilen, potasyum alüminyum sülfat ve sodyum iyodat manyetik karıştırıcıda (Biosan MSH 300, Letonya) ısıtılarak çözündürüldü. Kloral hidrat ve sitrik asit karışıma ilave edildi ve 5 dakika kaynatılıp, soğutuldu ve süzüldü.

Yöntem:

Testis doku bloklarından alınan kesitler etüvde (Nüve FN 400, Türkiye) 65°C'de 60 dakika tutulduktan sonra 3 defa 5'er dakika ksilenden geçirilerek deparafinizasyon işlemi sağlandı. Azalan konsantrasyondaki etil alkol serisi ile hidrasyon (%96 alkol 5 dakika, %80 alkol 5 dakika, %70 alkol 5 dakika) gerçekleştirildi. Kesitler distile sudan geçirildi ve akabinde %1'lik periyodik asit çözeltisinde 5 dakika tutuldu. Daha sonra distile su ile yıkanan kesitler Schiff çözeltisinde 20 dakika tutuldu. Musluk suyu ile 5 dakika yıkanmayı takiben, kesitlere Mayer hematoksilen ile 3 - 4 dakika nukleus boyaması yapıldı. Musluk suyu ile yıkanma aşamasını takiben doymuş lityum karbonatla nukleuslar belirginleştirildikten sonra, yükselen konsantrasyondaki etil alkol serisiyle (%70, %80, %96 ve %100 etil alkol) kesitler dehidrate edildi. Ksilenle şeffaflaştırılan kesitler sulu olmayan kapama (Thermo Scientific Shandon Consul - Mount Ref.9990440, ABD) maddesi kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Histopatolojik skorlama:

Preparatlarda histopatolojik hasarın derecesini değerlendirme amacına yönelik olarak, ışık mikroskobu ile ortalama 100 tübül sayılarak skorlama gerçekleştirildi.

Tüm deney gruplarındaki seminifer tübüllerde histopatolojik skor değerlendirmesi, her preparatı saat yönünde kaydırarak rastgele seçilen 5 benzer alanda, x400 büyütme altında yapılmıştır (Hess, Linder, Strader, Perreault 1988).

- 1) **Normal:** Normal spermatogenezis ve hücreler arası bağlantı.

2) **Regresif:** Seminifer tübüllerin bir veya birden fazla bozukluk içermesi: hücreler arası bağlantı normal olmakla birlikte gevşek hücresel organizasyon, hücresel dejenerasyon (piknotik çekirdek, granüler eozinofilik sitoplazma, karyolizis)

3) **Dejeneratif:** Düzensiz yerleşimli ve hücreler arası bağlantısı olmayan az sayıdaki germ hücreleri ve Sertoli hücreleri.

4) **Atrofik:** Sadece Sertoli hücreleri, ya nadiren germ hücreleri ve Sertoli hücreleri ya da az sayıda hücresel bağlantıları olmayan germ hücreleri ve Sertoli hücreleri.

Tüm doku preparatları Olympus BX51 fotomikroskop ve dijital kamera (Olympus C-5060, Tokyo, Japan) ile incelenerek değerlendirilip fotoğrafı andırıldı.

5.2. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Metodu

Testisten alınan yaklaşık Imm^3 'lük doku örnekleri %2,5'lük glutaraldehit (fosfat tampon içinde, pH: 7,4) solüsyonunda + 4°C'de 4 saat tutulduktan sonra, fosfat tampon içinde 1 gün bekletildi, %1'lik osmiyum tetraoksitle 2 saat süreyle postfiksasyon yapıp, daha sonra 15 dakika fosfat tamponda yıkandı. Yükselen konsantrasyondaki etil alkol serisinde (%50, %70, %90, %96 ve %100) 15'er dakikalık sürelerde bekletilen örnekler saf propilende 15 dakika 2 kere, sonra 1/1 oranında propilen/epon karışımında 1 gece süreyle rötarda bırakıldı. Testis doku örnekleri 1 saat vakum, 2 saat dışarıda olmak üzere saf eponda tutuldu. Epona gömülen dokular 1 gece süreyle 60°C'lik etüvde bırakıldı. Epon bloklardan ultramikrotomda (Leica Microsistem, Avusturya) alınan yarı ince kesitler (1 μ m) toluidin mavisi boyası ile boyandı. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra 200 mesh'lik bakır gridler üzerine alınan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı.

Kontrastlama aşaması:

Ependorfta %2'lik uranil asetat ve %50'lik metanol 1/1 oranında karıştırıldı. Diğer ependorfa İmi kurşun sitrat (+4°C'de) konuldu. Ependorflardaki iki solüsyon alüminyum folyo ile sarıldı ve 1500 - 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Parafın kaplı petrilerin içinde hazırlanan solüsyonlardan damlacık oluşturuldu. Uranil asetat damlacığında 40 dakika bekletilen gridler, distile su damlacıklarına alındı. Daha sonra her bir grid en az 20 mi distile su ile yıkanacak şekilde dikkatlice distile sudan geçirildi. Daha sonra, bir sonraki aşamada kurşun sitratta gridler 3 - 4 dakika bekletildi. Bu işlemler sırasında petride nem oluşmasını engellemek için petrinin kenarına 7 - 8 adet NaOH parçası konuldu.

Kontrastlanmış ince kesitler, Jeol 1200 SX Geçirimli Elektron Mikroskopu ve dijital kamera (Olympus Morada Soft Görüntüleme Sistemi) ile incelendi ve fotoğrafı andı.

5.3. Biyokimyasal İnceleme

Kan örnekleri, deney süresince ve deney sürelerinin bitiminde sıçanların kuyruk venlerinden ve kalplerinin atrium bölgesinden alınarak elde edildi. Deneyin başlangıcında ve deney süresince, sıçanların kuyruklarından alınan venöz kan örneklerinden kan glukoz düzeyi ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler glukometre ile gerçekleştirildi. Bu ölçümleri yapabilmek için glukoz oksidaz enzimi içeren tek kullanımlık kuru test stripi kullanıldı. Stripin ucundaki glukoz oksidaz enzimi bulunan kan toplama haznesine kan örneği yüklendi.

Ölçüm Yöntemi:

Stripte bulunan enzim glukozun oksidasyonunu katalize ederek glukonik asit üreterek çalışmaktadır. Reaksiyon sırasında iletken maddenin elektronları elektroda iletmesi ile akım oluşur. Akımın miktarı kandaki glukoz miktarı ile paraleldir. Glukoz yoğunluğu 5 saniyede ölçüldü ve ekrana yansıdı, buna bağlı olarak kandaki glukoz seviyesi belirlendi. Tüm gruplardaki hayvanların kuyruk

veninden alınan kan örnekleri deney başlangıcından hemen önce, STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra ve sakrifikasyondan hemen önce alınmıştır. Kontrol grubunda ise SF enjeksiyonundan hemen önce, 72 saat sonra ve sakrifikasyondan hemen önce olmak üzere kan glukoz düzeyi tayinleri yapılmıştır.

Sıçanların kalplerinin atriumundan alınan kan örnekleri ise 14000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapılarak serum eldesi sağlandı ve serumda malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) ölçümü yapıldı. Bu ölçümler aşağıda belirtilen protokoller doğrultusunda yapılmıştır.

Serum Malondialdehit (MDA, lipid peroksidasyon) ölçümü: Lipid peroksidasyon hasarını ölçmek için kullandığımız bir biyokimyasal belirteç olan MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı (Ohkawa, Ohishi and Yagi 1979) .

0,5 ml plazma üzerine 0,2 ml %8,1 sodyum dodesil sülfat, pH'sı 3,5 olan 1,5 ml %20 asetik asit ve 1,5 ml %0,8 tiobarbitürik asit solüsyonu eklenerek 95°C'de 60 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak absorbansı 532 nm'de ölçüldü.

Serum İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) ölçümü: Oksidasyon aracılı protein hasarını ölçmek için kullandığımız bir biyokimyasal belirteç olan AOPP'nin ölçümü spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntemle göre; AOPP oluşumu klorine oksidanların oluşumu (kloraminler ve hipokloröz asit gibi) ile indüklenerek gerçekleşen reaksiyona dayanmaktadır. Bu reaksiyon 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Witko-Sarsat et al 1996).

Çözeltiler ve çözeltilerin hazırlanması:

Asetik Asit, %96, v/v olacak şekilde hazırlandı. 1,16 M Ki PBS (20 mmol/l, pH:7,4) içerisinde hazırlandı. Kloramin-T stok solüsyonu (10 mmol/l), PBS (20 mmol/l, pH:7,4) ile seyreltilerek 1000 µmol/l konsantrasyonda ana standart çözeltisi elde edildi. Daha sonra bu çözelti de PBS (20 mmol/l, pH:7,4) ile

seyreltilerek 100, 250, 500, 750, 1000 μ mol/l konsantrasyonlarda Kloramin-T standartları hazırlandı ve kalibrasyon eğrisi elde edildi.

10 μ l serum üzerine 160 μ l PBS reaktifi eklenip karıştırılarak 25 saniye inkübe edildi. Sonra 20 μ l asetik asit eklenip, 25 saniye inkübe edildi. Son olarak 10 μ l Ki çözeltisi eklendi ve tekrar 25 saniye inkübe edilip absorbans 340 nm'de okutuldu. Tüm basamaklar 37°C'de gerçekleştirildi. Kloramin-T standart olarak kullanıldı. Ölçülen AOPP konsantrasyonları, Kloramin-T birimi ile μ mol/l olarak belirlendi.

Serum Glutasyon (GSH) ölçümü: Vücutta önemli bir antioksidan enzim olan GSH, spektrofotometrik redükte glutasyon yöntemi uygulanarak ölçülmüştür. Bu yöntemle göre proteinsizleştirilmiş örneklerdeki glutasyonun hem sülfidril, hem de primer amino grubu DTNB (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) ile şiddetli kolorimetrik türevler oluşturmaktadır. Oluşan sarı renkteki ürünün 412 nm'de konsantrasyonu hesaplandı ve sonuçlar μ mol / l olarak ifade edildi (Mergel, Andermann and Andermann 1979).

Çözeltiler ve Çözeltilerin hazırlanması:

Proteinsizleştirme çözeltisi: %15 lik Metafosforik çözeltisi hazırlandı. 1 M Sodyum fosfat tamponu (pH: 6,8): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tuzları kullanılarak pH'sı 6,8 olacak şekilde 100 ml tampon hazırlandı (%0,08 lik DTNB (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit).

Proteinsizleştirme işleminden sonra çökelti santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Üst fazda GSH tayini yapıldı. 500 μ l örnek üzerine 250 μ l 1M Na_2HPO_4 ve 500 μ l %0,08 DTNB çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 412 nm'de absorbanslar okundu.

5.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Graph- Pad Prism 3,0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. P değerinin 0,05'den daha küçük olması ($p < 0,05$) durumunda veriler anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Deneyde Kullanılan Hayvanların Ağırlıkları:

Deneyin bitiminde gruplar arası deney hayvanı ağırlıkları; kontrol grubunda ortalama hayvan ağırlığı 305 ± 20 gr iken STZ grubunda $260 \pm 8,94$ gr, oksitosin tedavi grubunda $254 \pm 50,03$ gr, oksitosin ön uygulama grubunda $285 \pm 49,96$ gr'dır (Tablo 2 ve Şekil 6).

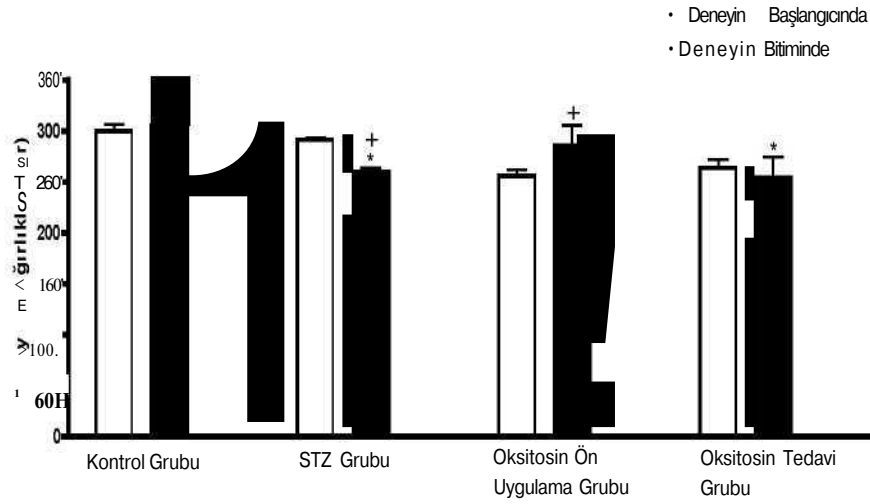
6.2. Testis Ağırlığı:

Deney sürelerinin bitiminde, sakrifikasyon sonrası, testis doku örnekleri alınmadan hemen önce, sıçanların sağ ve sol testis dokuları çıkartılarak ayrı ayrı tartılmış ve ağırlık ortalamaları alınmıştır.

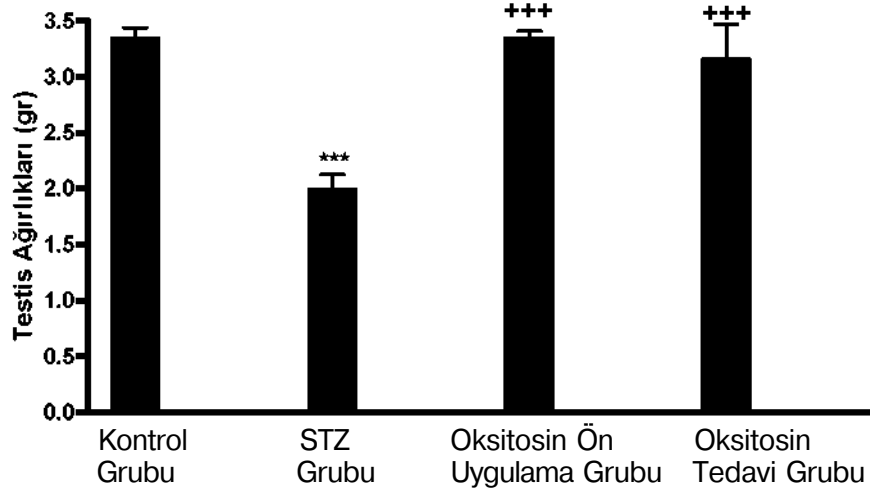
Kontrol grubunda ortalama testis ağırlığı $3,20 \pm 0,24$ gr iken bu değer STZ grubunda $1,98 \pm 0,31$ gr, oksitosin tedavi grubunda $3,14 \pm 0,77$ gr, oksitosin ön uygulama grubunda ise $3,34 \pm 0,16$ gr olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile STZ grubu kıyaslandığında testis ağırlığının düştüğü; oksitosin tedavi grubu ile oksitosin ön uygulama grubu kıyaslandığında ise oksitosin tedavi grubunda testis ağırlığının istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber daha fazla azaldığı gözlenmiştir (Tablo 2 ve Şekil 6).

Tablo 2:Deney sürelerinin başlangıcındaki ve bitimindeki deney hayvanlarının ağırlıkları (gr) ve testis ağırlıkları (gr) (ortalama ağırlık \pm standart sapma)

Gruplar	Deneyin başlangıcındaki deney hayvanlarının ağırlıkları (gr)	Deneyin bitimindeki deney hayvanlarının ağırlıkları (gr)	Deneyin bitimindeki deney hayvanlarının testis ağırlıkları (gr)
Kontrol grubu (n:6)	300 \pm 6,32	305 \pm 20	3,20 \pm 0,24
STZ grubu (n: 6)	292 \pm 4,88	260 \pm 8,94	1,98 \pm 0,31
Oksitosin ön uygulama grubu (n:6)	256 \pm 14,97	285 \pm 49,96	3,34 \pm 0,16
Oksitosin tedavi grubu (n: 6)	264 \pm 19,60	254 \pm 50,03	3,14 \pm 0,77



Şekil 5: Deney hayvanı ağırlıklarının deney grupları arasındaki istatistiksel analiz grafiği *: $p < 0,05$ kontrol grubuna göre; +: $p < 0,05$ deney başlangıcına göre kıyaslanmıştır.



Şekil 6: Deney grupları arasındaki testis ağırlıklarının istatistiksel analiz grafiği ***: $p < 0,001$ kontrol grubuna göre; +++: $p < 0,001$ STZ grubuna göre kıyaslanmıştır.

6.3. Deney Hayvanlarının Kan Glukoz Düzeyleri:

72 saat sonra ölçülen kan glukoz düzeyi ölçümleri sonrasında kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış bulunmuş olup, buna bağlı olarak STZ uygulaması yapılan deney gruplarında, diyabetin olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Oksitosin ön uygulama ve oksitosin tedavi gruplarında STZ grubuna kıyasla kan glukoz düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0,01$). Oksitosin ön uygulama grubunda ise kan glukoz düzeyinin oksitosin tedavi grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 3 ve Şekil 7).

6.4. Işık Mikroskopisi Bulguları

Kontrol, STZ, oksitosin ön uygulama ve oksitosin tedavi gruplarına ait parafin bloklardan alınan kesitler H&E boyası ve PAS reaksiyonuyla incelenmiştir.

6.4.1.Histopatolojik bulgular:

Kontrol Grubu:

Bu grupta, H&E ile boyanmış kesitlerde, normal testis yapısı gözlenmiştir. Seminifer tübüller ve seminifer epiteldeki spermatogenik hücreler normal yapıda olduğu görülmüştür. Birçok seminifer tübülün lümeninde çok sayıda spermatozoon görülürken destek hücreleri olan Sertoli hücreleri normal histolojik yapıyı yansıtmıştır. Düzgün kontüre sahip seminifer tübüller arasında normal yapılanmada interstisyel bağ dokusu mevcuttu. Tüm testis dokusunda normal seminifer tübüller yoğun olarak gözlenmiştir (Resim 2A).

Kontrol grubunda PAS reaksiyonu ile boyanmış kesitlerde, seminifer tübüllerin bazal membran yapısı kuvvetli PAS (+) reaksiyon veriyor olup, düzenli ve devamlı şekilde olduğu görülmüştür (Resim 2B).

STZ Grubu:

Bu grupta, H&E ile boyanmış kesitlerde seminifer tübüllerdeki spermatogenik seride hücrel kayıp ve hücrelerde ileri derecede hasar gözlenmiştir. Ayrıca bu hasarın yanı sıra hücreler arası alanlarda genişlemeler ve ayrılmalar dikkat çekici bulgular arasında olup, çok sayıda seminifer tübülün lümeninde yer alan döküntü hücrelerin varlığı belirlenmiştir (Resim 3A). Bu grupta regresif, degeneratif ve atrofik tübül sayısının kontrol grubuna kıyasla arttığı, normal tübül sayısının ise istatistiksel olarak azaldığı saptanmıştır ($p<0,001$).

STZ grubunda PAS reaksiyonu ile boyanmış kesitlerde, seminifer tübüllerin bazal membran yapısında da bozulmaların ve düzensizliklerin olduğu

görülmüştür. Özellikle seminifer tübül bazal membranlarında PAS reaksiyonu negatif olarak izlenmiştir(Resim 3B).

Oksitosin ön uygulama Grubu:

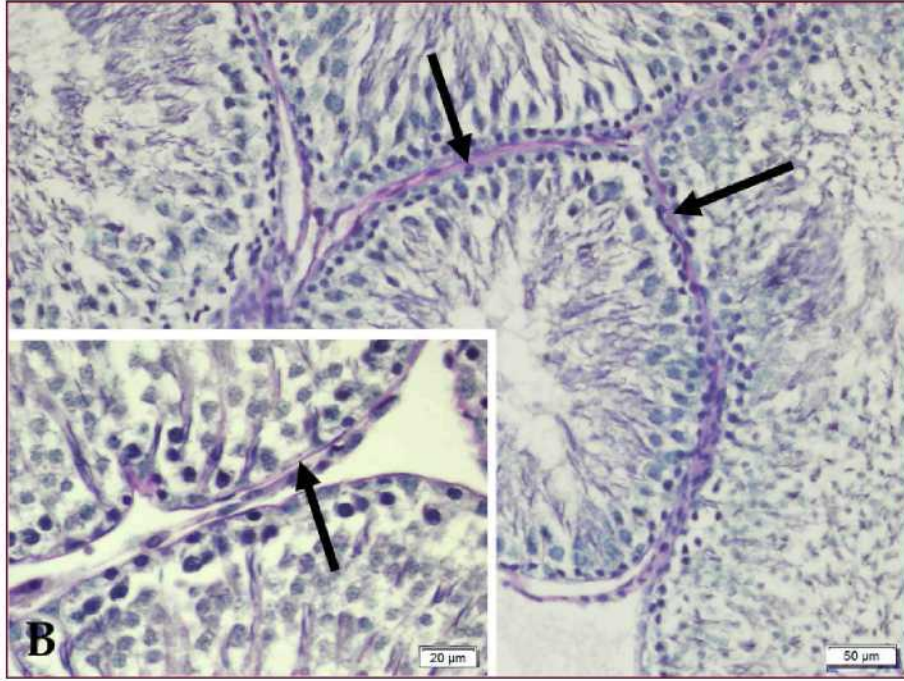
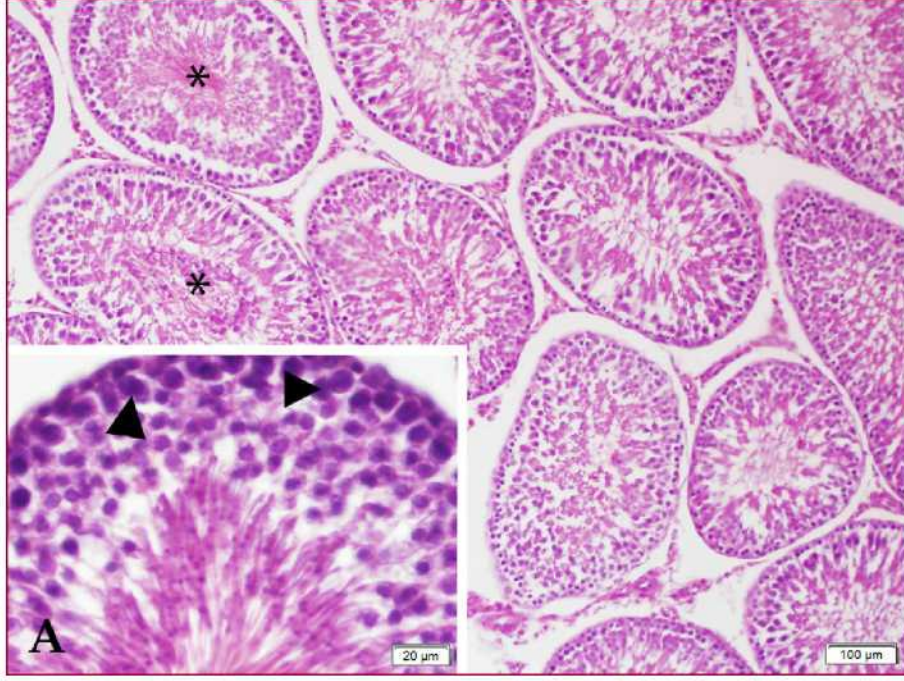
Bu grupta, H&E ile boyanmış kesitlerde, normale yakın testis yapısı gözlenmiştir. Diyabet grubuna kıyasla hücreler arası alanlarda yer yer genişlemeler olmakla birlikte genel olarak normal yapıdaki seminifer tübüllerin sayıca fazla olduğu ve spermatogenik seriye ait hücrelerin düzgün yapıda ve sıralanmada olduğu görülmüştür (Resim 4A). Ayrıca tübül tümenlerinde çok sayıda spermatozoa izlenmiştir. Bu grupta STZ grubuna kıyasla normal tübül sayısının artmış olduğu ve regresif tübül sayısında ise azalma olduğu gözlenmiştir.

Oksitosin ön uygulama grubunda PAS reaksiyonu ile boyanmış kesitlerde, seminifer tübüllerin bazal membranlarında kuvvetli PAS (+) reaksiyon gözlenmiştir. Ayrıca çoğu seminifer tübüllerin bazal membran yapısının düzenli olduğu ve bazı tübüllerde ise kontür düzensizliklerinin olduğu saptanmıştır (Resim 4B).

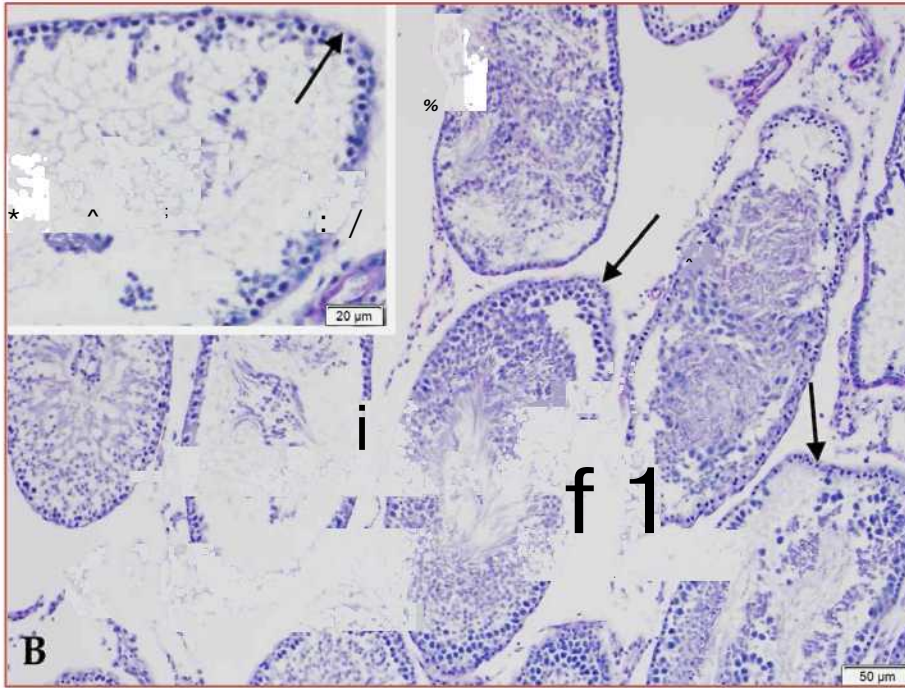
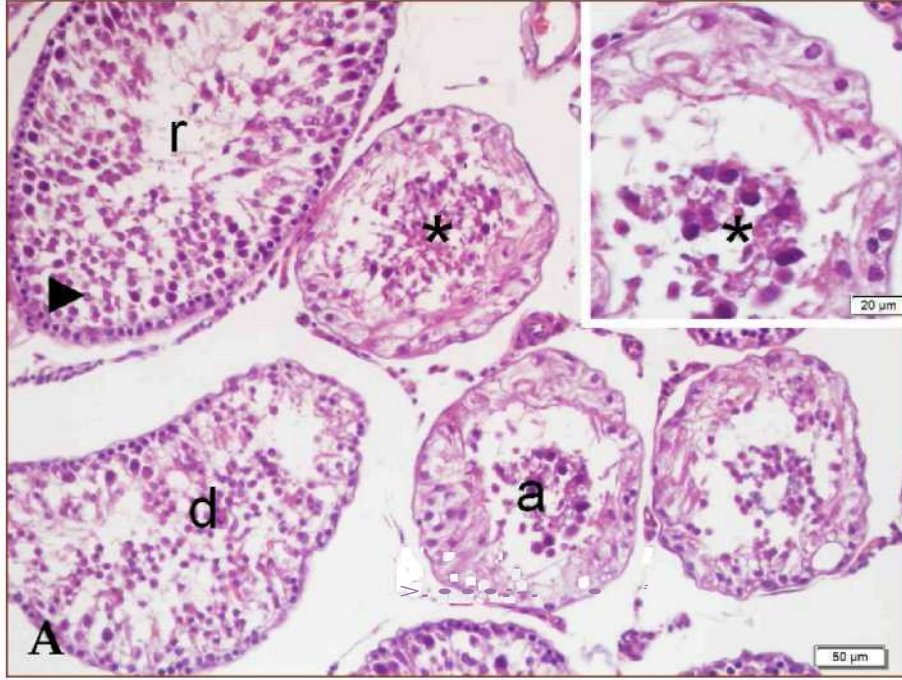
Oksitosin tedavi Grubu:

Bu grupta, H&E ile boyanmış kesitlerde, hasarlı seminifer tübül yapısı kontrol ve oksitosin ön uygulama grubuna kıyasla daha fazla sayıda izlenmiştir. Bazı spermatogenik seri hücrelerinde hücresel hasar izlenmiştir (Resim 5A). Bu grupta STZ grubuna kıyasla regresif tübül sayısı azalırken, degeneratif tübül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır($p<0,01$).

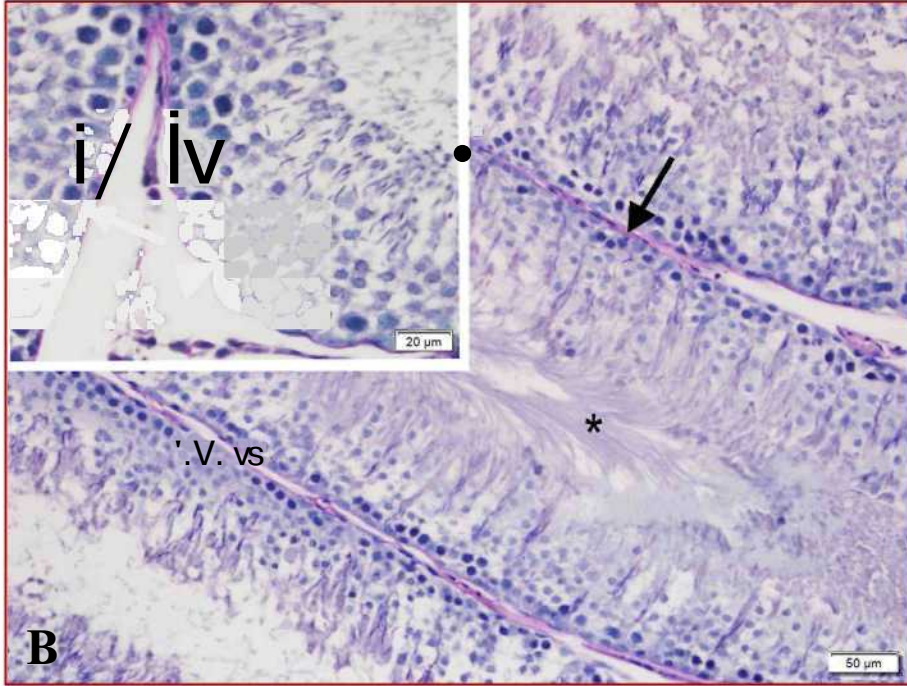
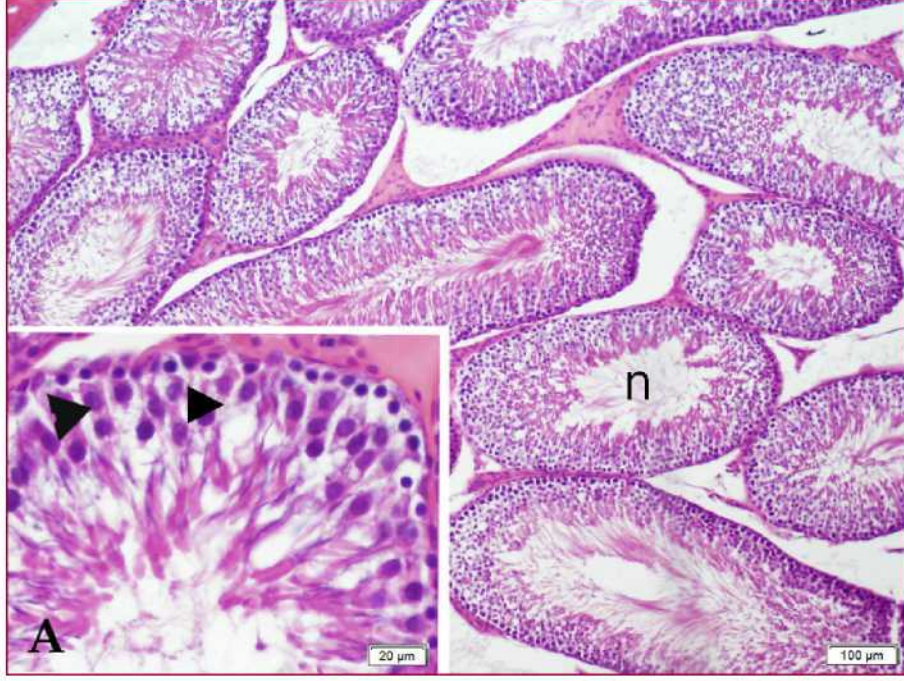
Oksitosin tedavi grubunda PAS reaksiyonu ile boyanmış kesitlerde, genel olarak seminifer tübüllerin bazal membranında PAS (+) reaksiyonda azalma saptanmıştır. Bazı seminifer tübüllerde normale yakın bazal membran gözlenirken bazı tübüllerde ise hasarlı bazal membran yapısı gözlenmiştir (Resim 5B).



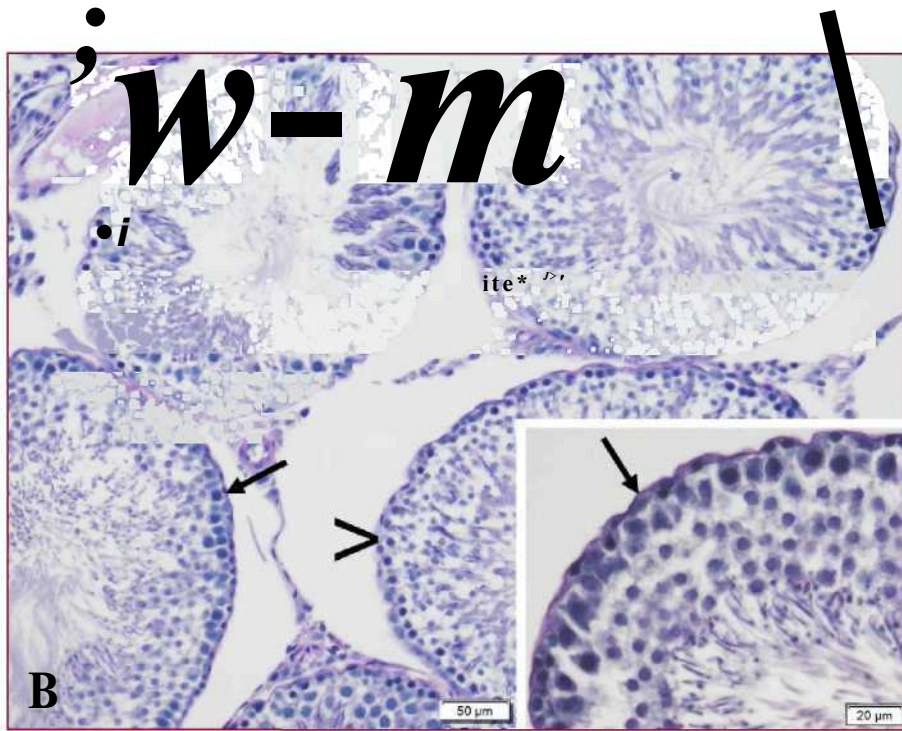
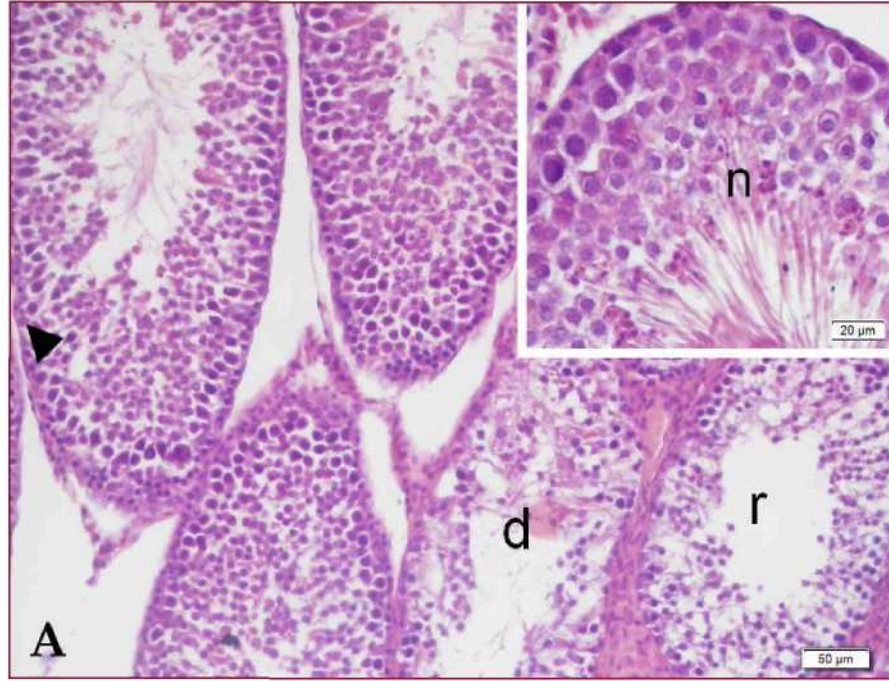
Resim 2: Kontrol grubu: A) Normal yapıdaki seminifer tübüller ve spermatogenik seri hücreleri (•), seminifer tübülün lümeninde çok sayıda spermatozoon (*) görülmektedir; B) seminifer tübüllerde yoğun PAS (+) reaksiyon veren, düzenli ve devamlı bazal membran yapısı (—•) izlenmektedir. A: H&E boyaması; B: PAS reaksiyonu.



Resim 3: STZ grubu: A) regresif (r), dejeneratif (d) ve atrofik (a) seminifer tübül yapıları, lümeninde döküntü hücreler (*) ve spermatogenik seri hücrelerinde hasar (•) gözlenmektedir; B) seminifer tübüllerin bazal membran yapısında bozulmalar ve PAS reaksiyonunda azalma (→•) görülmektedir. A: H&E boyaması; B: PAS reaksiyonu.



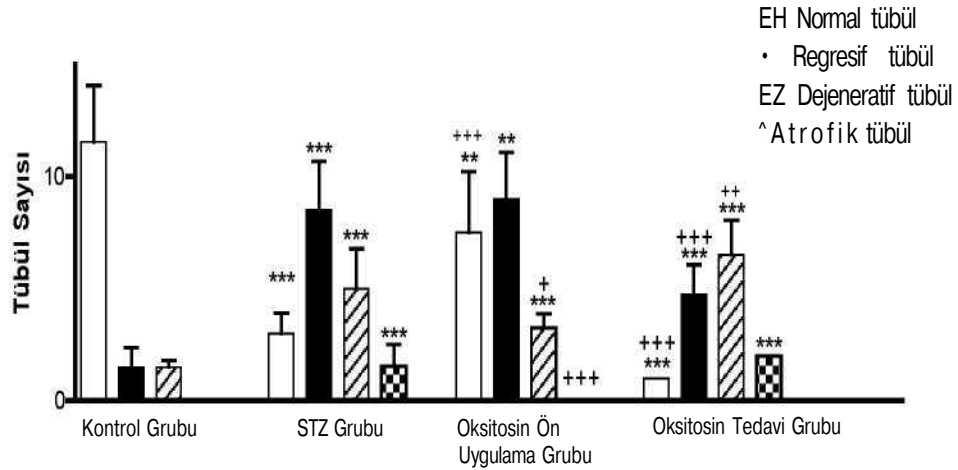
Resim 4: Oksitosin ön uygulama grubu: A) yer yer hücreler arası ayrılımların varlığında normal yapıya yakın seminifer tübül yapısı (n) ve spermatogenik seri hücreleri (•) gözlenmektedir; B) seminifer tübüllerde düzenli ve PAS (+) (→) bazal membran yapısı, bazal membranda kontür düzensizlikleri (•) ve lümende yer alan çok sayıda spermatozoon (*) görülmektedir. A: H&E boyaması; B: PAS reaksiyonu.



Resim 5: Oksitosin tedavi grubu: A) normal (n), dejeneratif (d) ve regresif (r) yapıda seminifer tübül yapıları ve spermatogenik seride harabiyeti yansıtır yer yer aynlmalar (•) izlenmiştir; B) Bazı seminifer tübüllerde PAS (+), normale yakın (—•) ve PAS reaksiyonu azalmış, hasarlı (>) bazal membran yapılan görülmektedir. A: H&E boyaması; B: PAS reaksiyonu.

6.4.2. Seminifer tübül histopatolojik skorlama bulguları:

Tüm deney gruplarındaki seminifer tübüllerde histopatolojik skor değerlendirilmesi; ışık mikroskopunda x400 büyütmede yapılmıştır (Hess, Linder, Strader, Perreault 1988). Buna göre kontrol grubunda ağırlıklı olarak normal seminifer tübül yapısı gözlenirken; STZ grubunda kontrol grubuna göre normal tübül sayısında anlamlı ($p<0,001$) azalma ve dejeneratif tübül sayısında anlamlı ($p<0,001$) artış olduğu görülmüştür. Oksitosin ön uygulama grubunda kontrol grubuna göre dejeneratif tübül sayısının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) olarak arttığı gözlenirken; kontrol grubu dışındaki diğer gruplara göre atrofik tübül sayısının daha az olduğu ($p<0,001$) belirlenmiştir. Ayrıca oksitosin ön uygulama grubundaki normal tübül sayısı STZ grubuna kıyasla anlamlı ($p<0,001$) bir artış göstermekte olduğu gözlenmiştir. Oksitosin tedavi grubunda ise normal yapıyı yansıtan tübül sayısı oksitosin ön uygulama grubundakine kıyasla anlamlı olarak ($p<0,001$) daha azdı (Şekil 8).



Şekil 8: Deney gruplarında seminifer tübüllere ait histopatolojik skorlama: normal, regresif, dejeneratif ve atrofik tübül sayısının gruplar arasındaki dağılımı. *: $p<0,05$ **: $p<0,01$ ***: $p<0,001$ kontrole göre, +: $p<0,05$ ++: $p<0,01$ +++: $p<0,001$ STZ grubuna göre kıyaslanmıştır.

6.5.Geçirimli Elektron Mikroskopisi Bulguları

Kontrol Grubu:

Seminifer tübüllerdeki germinal epitelin bazal laminası, Sertoli hücreleri ve spermatogonyumları normal ince yapıyı yansıtır nitelikteydi. Sertoli hücreleri arasında düzenli sıkı bağlantılar yer alırken, bazalden lümeneye doğru spermatogenik seriye ait değişik evrelerdeki spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin lümeninde düzenli yapıyı yansıtır nitelikte çok sayıda spermatozoonlar gözlenmiştir (Resim 6 ve 7).

STZ Grubu:

Bu grupta seminifer tübüllerin spermatogenik seri hücrelerinde belirgin hasar izlenmiştir. Hücreler sayıca azalmış olup, spermatogonyumlarda büyük vakuoller hücresel hasarı vurgular nitelikteydi. Sertoli hücrelerinin arasında ve Sertoli-spermatogonyumlar arasında yer alan sıkı bağlantı yapılarında belirgin ayrılmalar gözlenmiştir. Seminifer tübül bazal lamina yapısında ise bozulmalar belirgin olarak izlenmiştir. Sertoli hücre sitoplazmasına gömülü çok sayıda hasarlı sperm başları ve spermatositlerin varlığı spermatogenik seriye ait hasarı vurgulamakta idi (Şekil 8 ve 9).

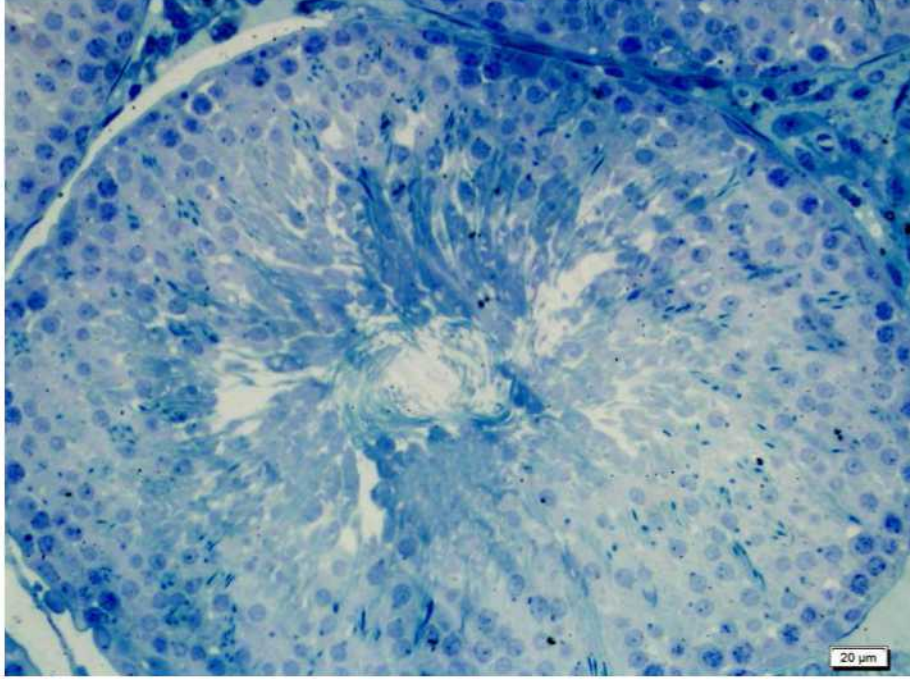
Oksitosin ön uygulama Grubu:

Oksitosin ön uygulama grubunda normale yakın bir ince yapıyı yansıtır nitelikte spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri izlenirken, Sertoli hücreleri arasında ve Sertoli-spermatogonyumlar arasındaki sıkı bağlantılar normale yakın yapıda gözlenmiştir. Bazı tübüllerin bazal bölümlerinde yer alan spermatogenik seriye ait hücrelerde vakuol oluşumları ve hücreler arası alanlarda açılmalar gözlenmiştir. Birçok tübülde bazal lamina düzgün yapıda olduğu gözlenmiştir.

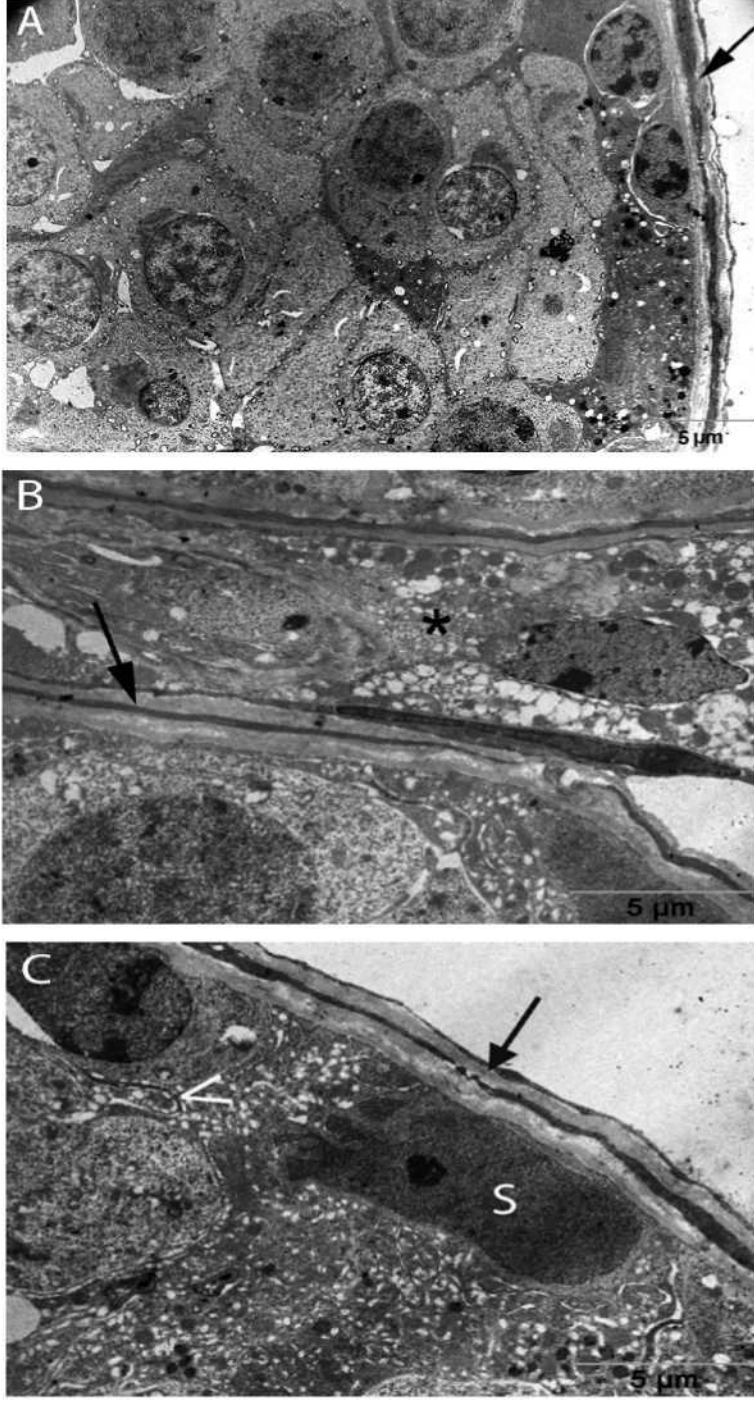
Ayrıca luminal bölgede çok sayıda düzgün morfolojide sperm kuyrukları gözlenmiştir (Resim 10 ve 11).

Oksitosin tedavi Grubu:

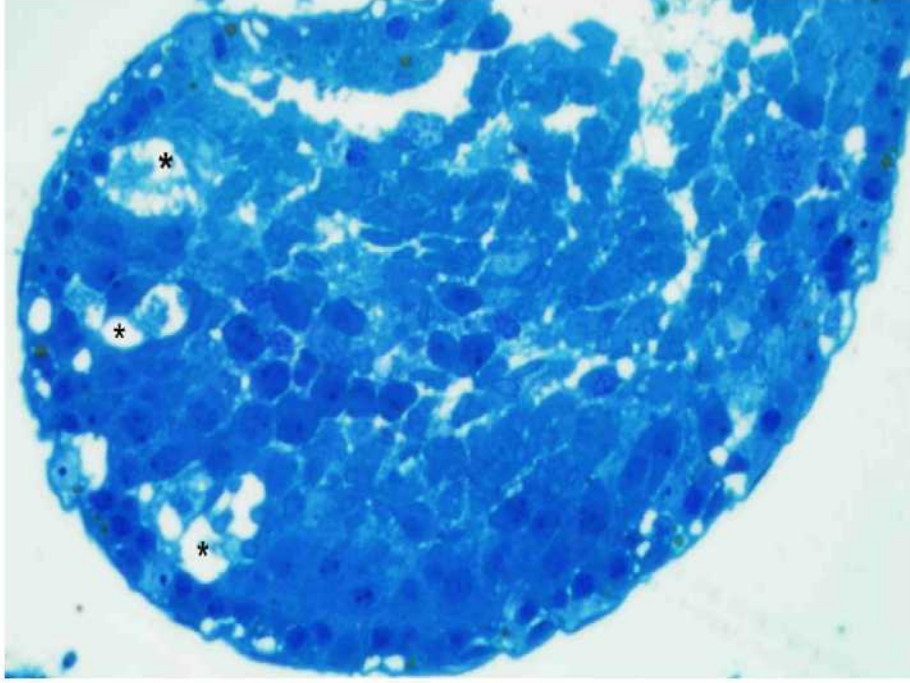
Oksitosin tedavi grubunda seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde düzenli yapıda Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri gözlenirken bazı alanlarda hasarlı yapıda ve vakuol içeren spermatogonyumlar izlenmiştir. Bazı seminifer tübüllerde bazal laminaya yakın bölgelerde hücreler arası sıkı bağlantı yapılarında ayrılmalar gözlenmiştir(Resim 12 ve 13).



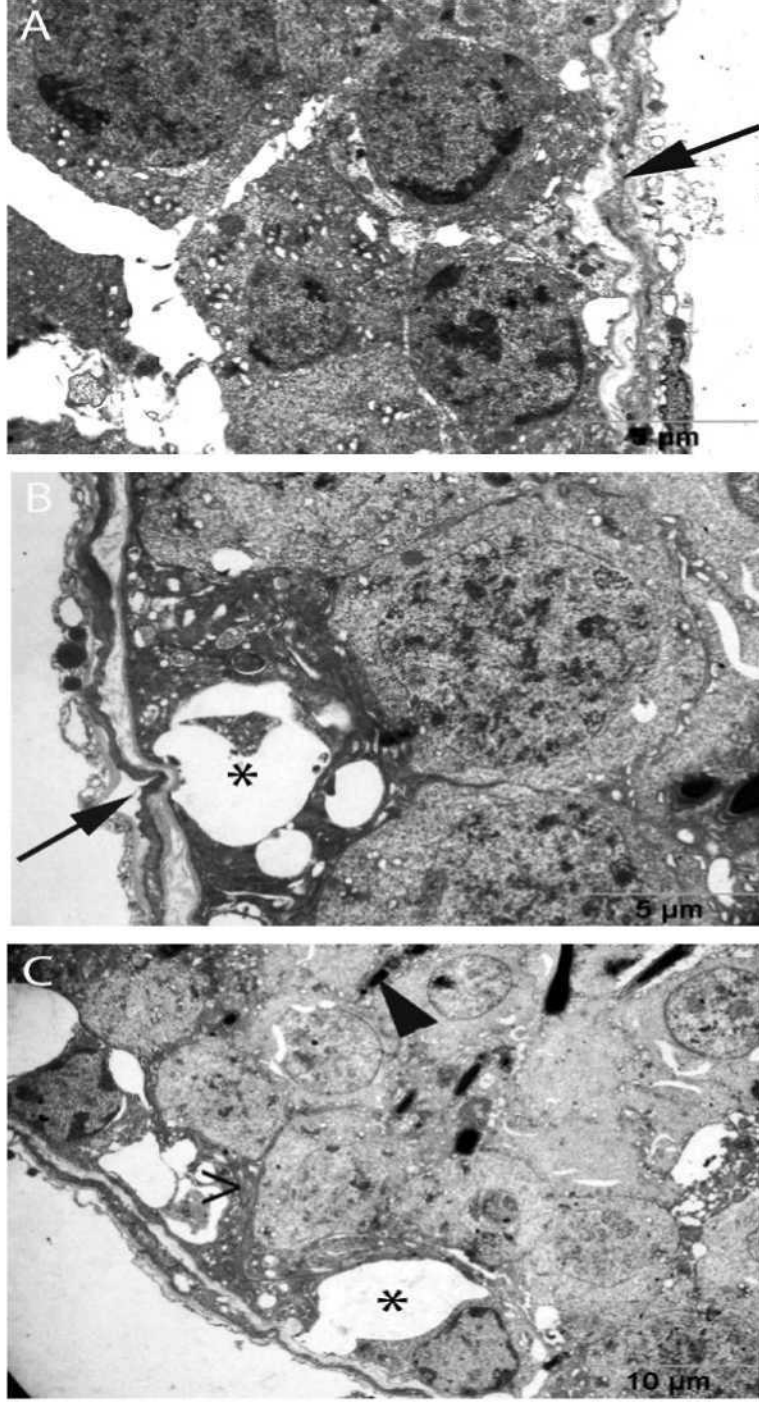
Resim 6: Kontrol grubuna ait yarı ince kesitte: normal yapıyı yansıtır nitelikte seminifer tübüldeki spermatogenik seri hücrelerinin düzenli sıralanması görülmektedir (Toluidin mavisi boyası).



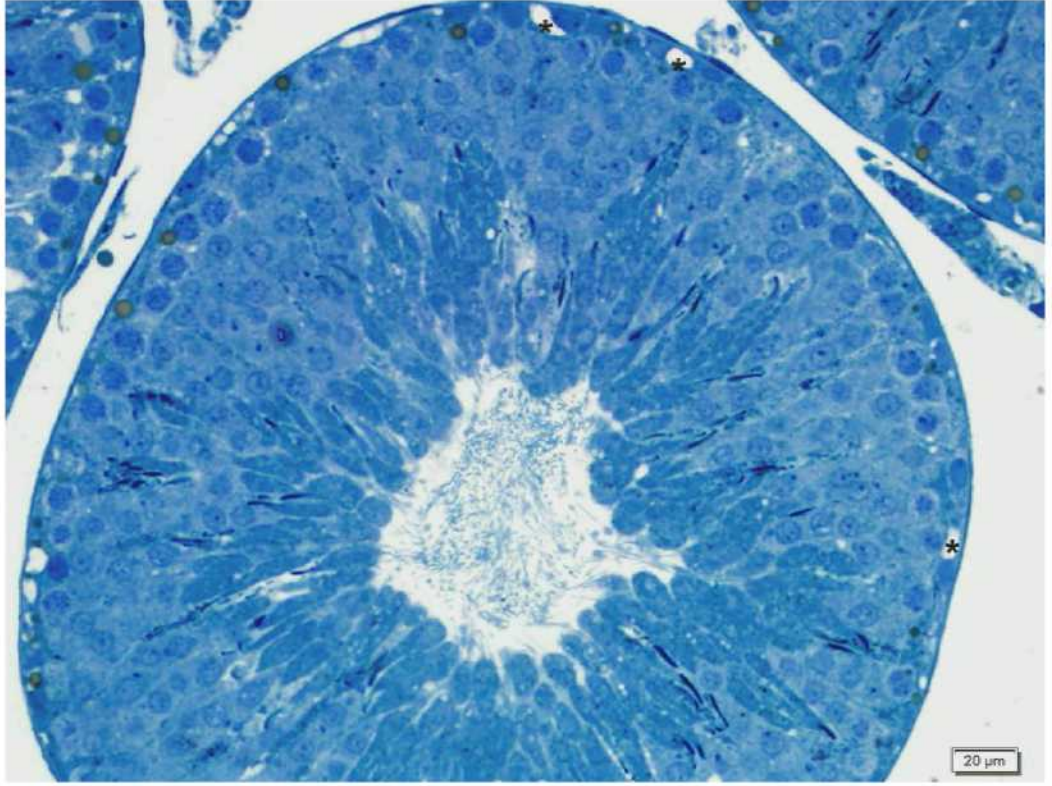
Resim 7: Kontrol grubu: A) Bazal lamina (\leftrightarrow) üzerine oturan düzenli yapıdaki spermatogonyumlar, B) İnterstisyel alan (*) ve bazal lamina (\rightarrow) yapısı C) Sertoli hücresi (S), hücreler arası sıkı bağlantı yapıları (>) ve bazal lamina (\rightarrow) yapısı görülmektedir (TEM mikrografı).



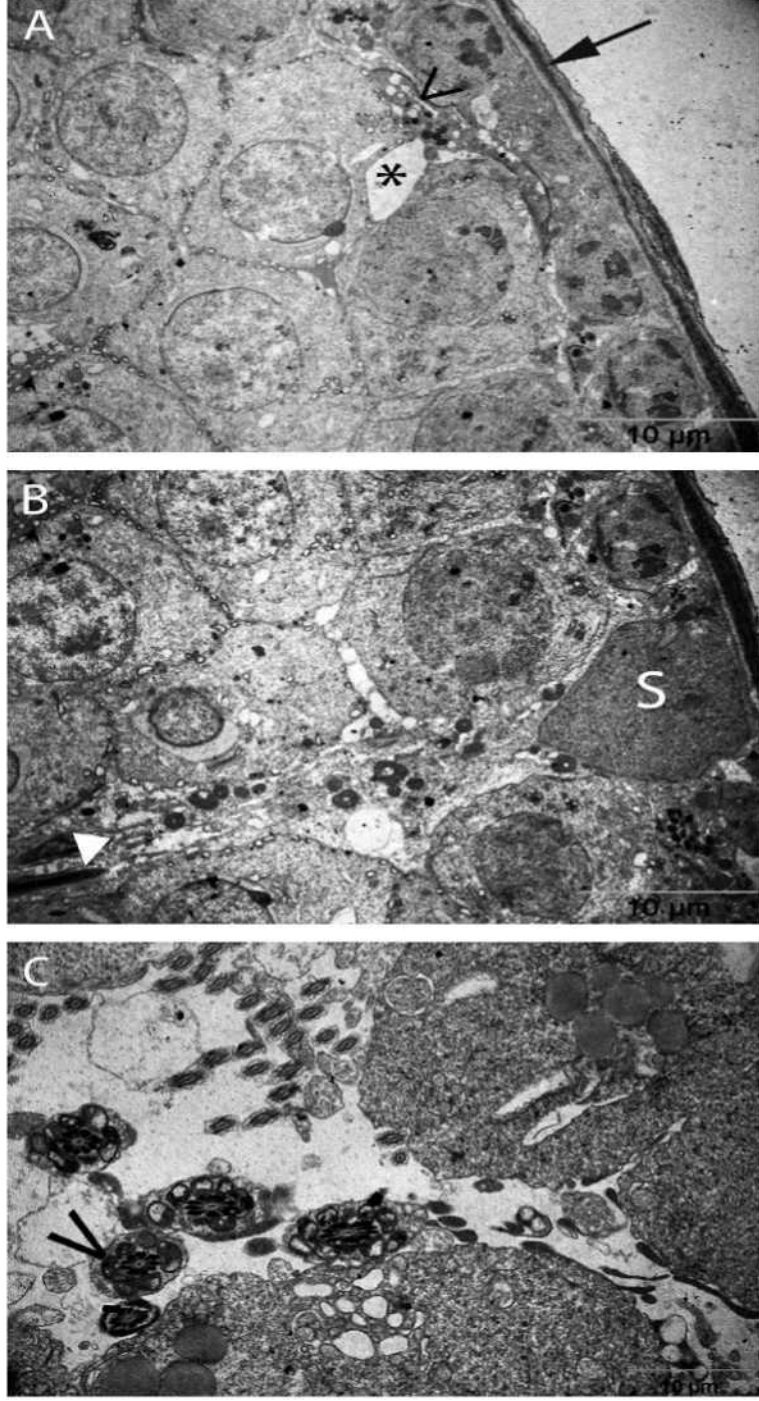
Resim 8: STZ grubuna ait yarı ince kesitte: seminifer tübül yapılanmasında birçok vakuolizasyon (*) ve belirgin yoğun hasar izlenmektedir (Toluidin mavisi boyası).



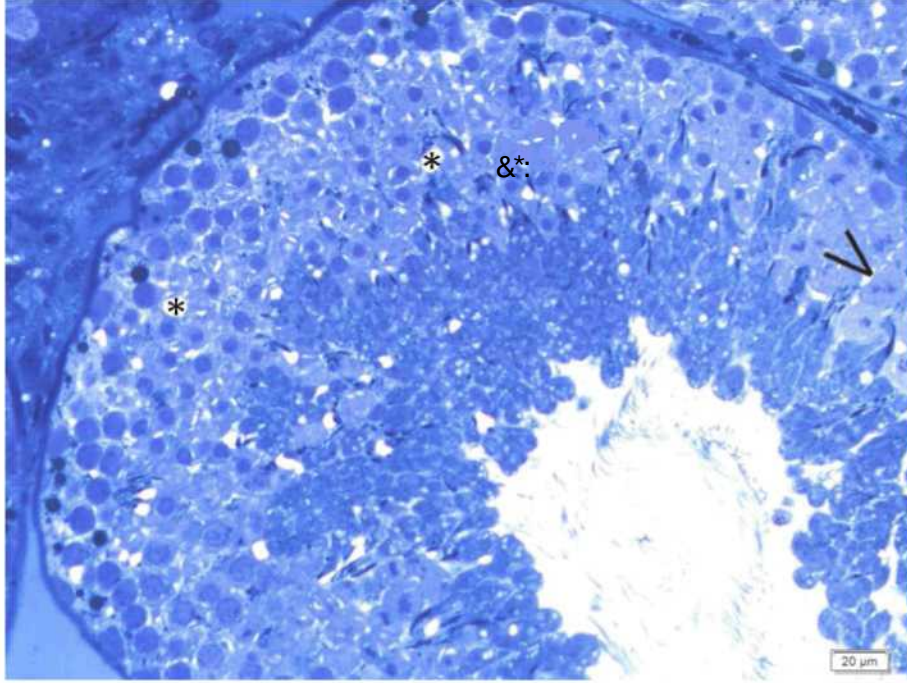
Resim 9: STZ grubu: A) az sayıda spermatogenik hücre içeren hasarlı seminifer tübül ve bazal lamina yapısı (\leftrightarrow), B) vakuoller (*) ve hasarlı bazal lamina yapısı (\rightarrow), C) Sertoli hücre sitoplazmasına gömülü hasarlı sperm başları (\bullet) ve spermatogonyumların sitoplazmasında büyük vakuoller (*) ve hasarlı sıkı bağlantı yapıları ($>$) görülmektedir (TEM mikrofotografı).



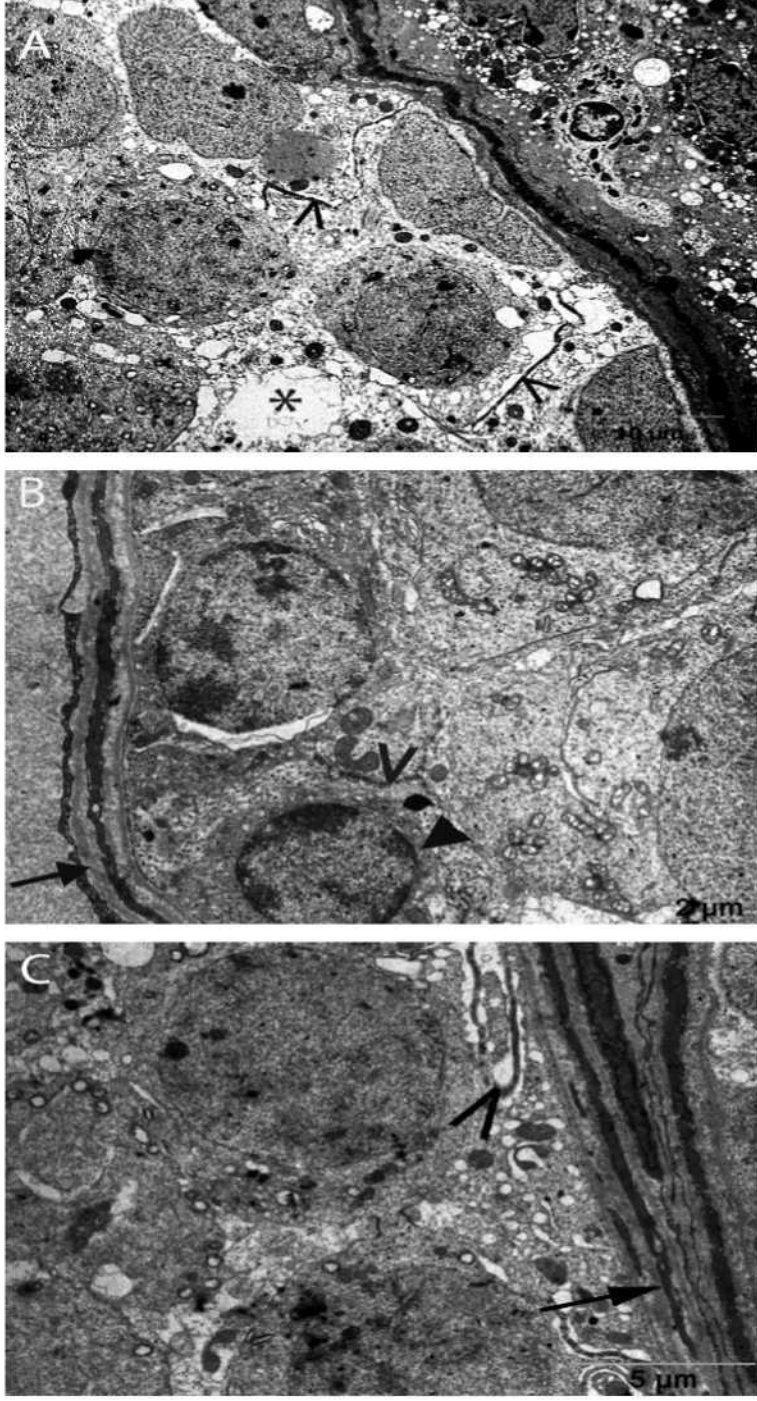
Resim 10: Oksitosin ön uygulama grubuna ait yarı ince kesitte: normale yakın yapıda seminifer tübül yapısı, çok nadir alanda vakualizasyon (*) ve spermatogenik seri hücrelerin sıralanması gözlenmektedir (Toluidin mavisi boyası).



Resim 11: Oksitosin ön uygulama grubu: A) Düzgün yapıyı yansıtan bazal lamina(^) üzerinde bulunan spermatogonyumlar ve tübülün bazal bölümlerinde sıkı bağlantıların (>) etrafındaki sitoplazma bölgelerinde alanlarda sınırlı sayıda vakuol oluşumu (*), B) düzenli yapıda sperm başları (•), Sertoli hücreleri (S) ve spermatogenik seri hücreleri, C) luminal bölgede çok sayıda düzgün yapıyı yansıtır sperm kuyrukları (V) gözlenmiştir (TEM mikrografı).



Resim 12: Oksitosin tedavi grubuna ait yarı ince kesitte: seminifer tübüllerde normale yakın yapılanmanın yanı sıra yer yer spermatogenik hücrelerde vakuolizasyon (*) ve hücreler arası alanda açılmalar (>) görülmektedir (Toluidin mavisi boyası).



Resim 13:A) Oksitosin tedavi grubu: hasarlı spermatogonyumlarda vakuol yapısı (*) ve hasarlı sıkı bağlantı (>) yapıları, B) düzgün yapıda bazal lamina (-•), sıkı bağlantı yapısı (>) ve spermatogonyum (•), C) bazal membrana (-•) yakın bölgelerde hücreler arası sıkı bağlantı (>) yapılarında açılmalar görülmüştür (TEM mikrografi).

6.6. Biyokimya Bulguları

Kan MDA Bulguları:

STZ grubunda MDA seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmişken ($p<0,001$) oksitosin ön uygulama grubunda ve oksitosin tedavi grubunda MDA seviyesinde STZ grubuna göre anlamlı olarak azalma saptanmıştır($p<0,001$) (Tablo 4 ve Şekil 8).

Kan GSH Bulguları:

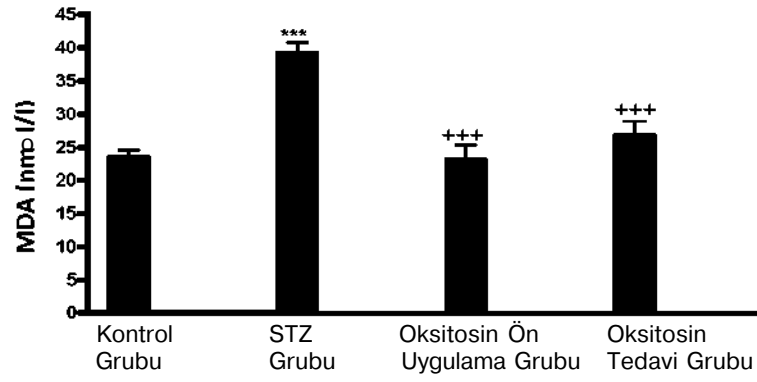
STZ grubunda GSH seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu izlenmişken ($p<0,001$), oksitosin tedavi ve ön uygulama gruplarında STZ grubuna kıyasla GSH düzeyinde artış olduğu görülmüştür($p<0,001$) (Tablo 4 ve Şekil 8).

Kan AOPP Bulguları:

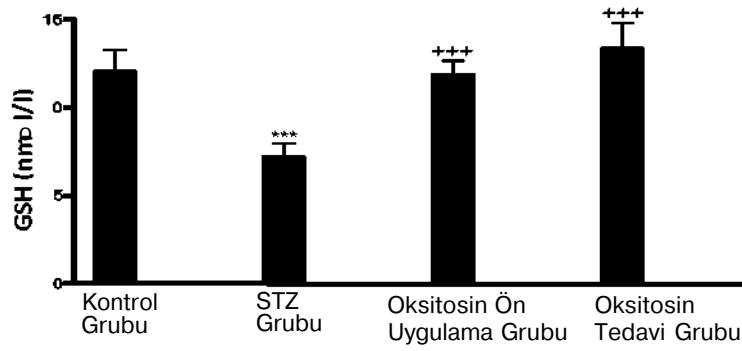
STZ grubunda kontrol grubuna kıyasla AOPP düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,001$). Oksitosin ön uygulama grubunda ($p<0,001$) ve oksitosin tedavi grubunda ($p<0,05$) STZ grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (Tablo 4 ve Şekil 8).

Tablo 4: Biyokimyasal veri tablosu (MDA: nmol/l; GSH ve AOPP: μ mol/l)
(ortalama değer \pm standart sapma)

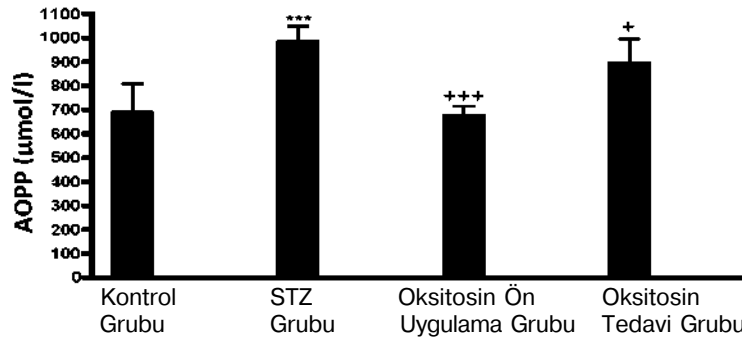
Gruplar	MDA (nmol/l)	GSH (μ mol/l)	AOPP (μ mol/l)
Kontrol grubu (n:6)	23,47 \pm 2,66	12,04 \pm 3,08	688,40 \pm 293,13
STZ grubu (n:6)	39,26 \pm 4,00	7,20 \pm 1,95	983,83 \pm 163,80
Oksitosin tedavi grubu (n:6)	26,89 \pm 5,23	13,40 \pm 3,54	896,83 \pm 249,55
Oksitosin ön uygulama grubu (n:6)	23,22 \pm 5,44	11,90 \pm 1,96	676,83 \pm 96,48



A



B



C

Şekil 9: A) Malondialdehit (MDA), B) Glutasyon (GSH), C) İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) değerlerinin gruplar arası istatistiksel analiz grafiği +:p<0,05, ++:p<0,01, +++:p<0,001 STZ grubuna göre, ***: p<0,001 kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

STZ uygulanarak deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda, STZ öncesi ve sonrası oksitosin uygulanması sonucu testis dokusunda meydana gelen değişiklikler histopatolojik ve biyokimyasal düzeyde incelenmiştir. Çalışmamızda ışık mikroskopi ve geçirimli elektron mikroskopi görüntüleme yöntemleriyle birlikte biyokimyasal düzeyde kan glukoz düzeyi ölçümü ve glutatyon, malondialdehid ve ileri oksidasyon protein ürünleri ölçümüne yer verilmiştir.

Son 20 yıla bakıldığında fertil erkeklerin sperm sayısında %2,6 ve morfolojisinde %0,7 azalma olduğu saptanmıştır (Auger, Kunstmann, Czyglik, Jouannet 1995). Spermatogenez sürecinin geçirilmiş enfeksiyonlar, genetik sebepler, hormonal bozukluklar, diabetes mellitus, böbrek yetmezliği gibi metabolik hastalıklardan, kişinin yaşam tarzı ve beslenmesinden belirgin şekilde etkilendiği literatür verilerinde sıklıkla vurgulanmaktadır (Sharpe 2010, Avcı 2001, Bacetti 2002).

Diabetes mellitus yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabet bu özellikleriyle toplumun en önemli sağlık sorunlarından biridir. Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık 346 milyonu diyabet hastası olup, bu insanların 300 milyonu gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Yirminci yüzyılda dünyada 3.4 milyon kişi diyabet ve diyabet kaynaklı yüksek şeker düzeyi verilerinden ölmüştür. Bu sağlık sorunu iyileştirilmediği takdirde yirmi birinci yüzyılda belirtilen oran daha da yüksek olabilir(WHO,FactSheetNo.312. Ağustos2011,<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, Erişim tarihi: 15 Mayıs 2012).

Diyabetli hastaların üreme problemleri olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Diyabetin testis fizyolojisi ve morfolojisi üzerine gösterdiği zararlı etkiler çeşitli deneysel uygulamalarla oluşturulan diyabetli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Deneysel diyabet oluşumunda STZ yaygın olarak kullanılmaktadır. STZ

uygulanarak oluşturulan hipergliseminin derecesi ve süresi, ilacın dozuna ve deney hayvanının türüne bağlıdır. Kedi, köpek, sıçan ve farede 45 - 80 mg/kg doz diyabet oluşturma açısından yeterli iken, tavşanda 300 mg/kg, hamsterde 175 mg/kg ve piliçlerde 130 mg/kg gereklidir (Tunçdemir 2006).

Sıçanlarda 45 mg/kg STZ uygulanarak diyabet oluşturulan ve melatoninin koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada, 14 hafta sonra kronik diyabet olduğu bildirilmiştir (Guneli et al 2008). Başka bir çalışmada ise 45 mg/kg STZ ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde testiküler hasarın yaklaşık 4 ve 8 hafta aralığında oluşabileceği gösterilmiştir (Öztürk, Gül, Ağkadir ve Yağmurca 2002). Bu çalışmalarda kan glukoz düzeyleri 200 mg/L olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir.

Wistar albino sıçanlarda yapılan çalışmalarda, diyabet oluşturmak amacıyla 65 mg/kg STZ kullanıldığını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (Tang et al 2008, Tunçdemir 2006). Bu çalışmalarda, 65 mg/kg STZ uygulamasını izleyen ilk 24 saat içerisinde kan şekeri, serum insülin ve glukagon düzeylerinde oluşan değişim göz önüne alınarak, kalıcı hipergliseminin olduğu kabul edilmiştir. Kan şekeri değerleri 200 mg/L üstünde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiş ve 4.haftanın bitiminde sakrifiye edilerek testisler incelenmiştir (Tang et al 2008, Tunçdemir 2006).

Çalışmamızda STZ sonrası gelişmesi beklenen testis hasarının oluşabilmesi için 65 mg/kg STZ dozu i.p. olarak enjekte edilmiş ve 4 hafta süreyle bekletilmiştir. Deney süresince hayvanlarının kuyruklarından alınan venöz kan örneklerinde glukoz düzeyleri ölçülmüştür. 72. saatte ve sakrifikasyondan hemen önce alınan kan örneklerinde glukoz düzeylerinin 200 mg/L üzerinde ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular eşliğinde daha önceki yapılmış çalışmalara uyumlu olarak çalışma gruplarımıza ait deney hayvanlarında deneysel diyabetin geliştiği sonucuna varılmıştır.

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda *Urtica dioica L.* bitkisinin yaprak ekstratının seminifer tübüller üzerine olan koruyucu etkisini inceleyen bir çalışmada diyabetik grupta, Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlarda

vakuolizasyon görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada sperm sayısında azalma ve seminifer tübül epitelinin boyutunun belirgin oranda değişmesi önemli bulgular arasında yer almaktadır. Diyabetle birlikte *Urtica dioica L.* bitkisinin verildiği grupta diyabetin oluşturduğu hasar kısmı olarak azalmaktadır (Golalipour, Balajade, Ghafari, Azarhosh and Khori 2011).

STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabetli hayvanlarda yapılan diğer bir çalışmada testis dokusunda hücresiz tabakalardaki kollajen miktarının artması sonucu peritübüler alanlarda kalınlaşmalar ve bu kalınlaşmaların varlığında interstisyel alandan gelen testosteronun Sertoli hücrelerine iletilmesini engellediği belirtilmektedir. Bu kalınlaşmaların spermatogenez sürecinde bozulmalara, germinal epitel hücrelerinin beslenememesine, olgunlaşmamasına ve bu hücrelerin lümenine dökülmesine neden olduğu da vurgulanmıştır (Aytekin, Ay kaç, Beler ve Erbenği 1987).

Erkek sıçanlarda diyabetin üreme sisteminde oluşturduğu hasara karşı sarımsak suyunun etkisini araştıran bir diğer çalışmada sarımsak suyunun koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada diyabetin oluşturduğu hasara bağlı olarak Leydig hücre sayısında ve testis ağırlığında azalmanın yanı sıra serum testosteron ve östradiol seviyelerinde düşüş olduğu da gösterilmiştir. Buna karşın sarımsak suyu uygulaması yapılan gruplarda (diyabete karşı koruyucu ve tedavi edici olarak) belirgin olarak Leydig hücre sayısında ve testis ağırlığında diyabet grubuna kıyasla artış olduğu bildirilmiştir (Abdolahnejad, Gol and Dabiri 2009).

Başka bir çalışmada da, diyabetik hayvanlarda seminifer tübülün bütünlüğünün bozulduğu; germinal epitelin bağ dokusundan ayrıldığı, tübül duvarlarında invaginasyonların olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulara ek olarak, primer spermatositlerden itibaren seminifer tübül epitel hücreleri arasında boşlukların oluşması, tübül lümeninde hiyalinizasyonun varlığı ve anormal morfolojik yapıya sahip spermatidlerin görülmesi ile diyabetik hayvanların testis yapısında ve fonksiyonunda önemli bozuklukların olduğu bildirilmiştir (Kapucu 2006).

Bu çalışmada STZ ile oluşturulan deneysel diyabete bağlı olarak testis ağırlığında azalma, seminifer tübüllerdeki spermatogenik seri hücrelerinde hasar ve sayıca azalma gözlemledik. Çalışmamıza ait oksitosin ön uygulama grubunda ise STZ grubuna kıyasla seminifer tübül hasarında düzelmeye beraber seminifer tübül tümenlerinde çok sayıda normal yapıyı yansıtır nitelikte spermatozoa mevcuttu. Ayrıca, PAS reaksiyonunda azalma beraberliğinde bazal membran yapısındaki hasar ve bozulmalar STZ grubunda izlediğimiz diğer bulgular arasında idi. Oksitosin uygulanan gruplarda ise bazal membran yapısının normal yapıya yakın olarak bütünlüğünün korunmuş olduğunu ve PAS reaksiyonu pozitivesinin kontrol grubundakine yakın olduğunu gözlemledik.

Hess skorlamasının uygulandığı çalışmalara örnek olarak; radyasyon ve hipertermi ile testiküler patoloji oluşturulmuş bir çalışmada atrofik, rejeneratif, dejeneratif ve atrofik tübüller sayılmış ve kontrole göre kıyaslanmıştır. Bu çalışmada radyasyon ve hipertermi sonrasında atrofik yani tek sıra Sertoli ya da germ hücrelerinden oluşmuş tübül sayısının sayıca artmış olduğu saptanmıştır (Erkanlı 2008). Hess skorlamasının uygulandığı diğer bir çalışmada ise vazektomi uygulanmış sıçanlarda testiste okludin dağılımındaki değişiklikler gözlenmiştir. Tüm gruplardaki testis dokusunda atrofik, rejeneratif, dejeneratif ve atrofik tübüller sayılmıştır. Ve vazektomi süresi arttıkça atrofik tübül sayısının arttığı buna paralel olarak okludin immunohistokimyasında azalma saptanmıştır (Contuk, Orun, Ekşioğlu and Ercan 2012).

Biz de çalışmamızda testiküler histopatolojiyi göstermek amacıyla Hess skorlamasını kullandık. Skorlama sonrasında atrofik tübül sayısının STZ grubunda artmış olduğu, oksitosin uygulanan gruplarda ise hasarlı tübül sayılarının azalmış olduğunu gözlemledik. Oksitosin ön uygulama grubunda ise hasarlı tübül sayısının STZ ve oksitosin tedavi gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşmüş olduğunu saptadık.

Oksidatif stres ve sperm yapısının incelendiği diğer bir çalışmada; testiste kanla taşınan toksik maddelerin oksidan antioksidan sistem arasındaki dengeyi dokuların aleyhine değiştirmesi olasılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu

durumda artan serbest radikallerin, testiste doku hasarına yol açtığı ve oksidatif stresin spermatozoon fonksiyonlarını bozarak anormal spermatozoon üretimine neden olduğu ifade edilmiştir (Zalata, Ahmed, Allamaneni, Comhaire and Aganval 2004). Biz de çalışmamızda STZ ile oluşan diyabete bağlı gelişen serbest radikal hasarını ve buna bağlı oluşan anormal spermatozoon yapısını gözlemledik.

Antioksidanların, STZ ile oluşturulan testis hasarı üzerinde koruyucu etkisi olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.

Yapılan deneysel bir çalışmada STZ ile oluşturulan diyabet modelinde dokulardaki antioksidan etkisi bilinen kuarsetinin spermatogenez üzerine koruyucu etkisi araştırılmış olup, kuarsetin tedavisi uygulanan grupta STZ etkisiyle artmış olan serumdaki MDA düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (Khaki et al 2009, Kanter, Aktas and Erboga 2012).

Önemli bir antioksidan madde olarak kabul edilen melatoninin diyabette erkek üreme hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; melatoninin, oksidatif hasarı azaltmada etkin olduğu ifade edilmiştir (Guneli et al 2008).

Çeşitli dokularda hücre koruyucu etkisi olan oksitosinin antioksidan etkisi ise son yıllarda yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Thackare, Nicholson and Whittington 2006; Duridanova, Nedelcheva and Gagov1997, Monstein, Grahn, Truedsson and Ohlsson 2004). Oksitosinin erkek üreme sistemi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar bulunmasına karşın diyabetik testis üzerine etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Oksitosinin testis ve epididimis üzerine olan etkisini inceleyen bir çalışmada, oksitosinin 5 α -redüktaz aktivitesini arttırdığı ve böylece üreme sisteminde otokrin ve parakrin bir rol üstlenerek steroid metabolizmasında önemli bir görevi olduğu bildirilmiştir (Gimpl and Fahrenholz 2001). Ayrıca oksitosinin antioksidan olarak ekzojen uygulandığı bir çalışmada; oksitosinin spermatogenez ve sperm transfer sürecini hızlandırdığı gözlenmiştir (Assinder, Rezvani and Nicholsan 2002).

Biz de çalışmamızda STZ uygulanarak diyabet oluşturulmuş sıçanların testislerinde doku hasarını önlemek ve oluşan hasarı tedavi etmek amacıyla son yıllarda antioksidan madde olarak kullanılan ve aynı zamanda çeşitli endojenik etkileri de bulunan bir peptid olan oksitosini kullandık. Çalışmamızda oksitosin ön uygulamasının ve tedavi amaçlı uygulamalarının STZ'nin oluşturduğu hasara karşı testis dokusunu koruduğu belirlenmiştir. Oksitosin ön uygulama grubunda, histopatolojik skor değerinin oksitosin tedavi grubuna göre anlamlı olarak daha düşük oluşu çalışmamızda gözlemlediğimiz önemli bir bulgu olmuştur.

Çeşitli testis hasar modeli çalışmalarında değişik maddelerin antioksidan etkilerini araştırmak için MDA, GSH ve AOPP gibi biyokimyasal parametrelere bakılmıştır.

Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda resveratrolün testis dokusundaki antioksidan etkisi değerlendirmeye yönelik bir çalışmada, testis dokusunda biyokimyasal düzeyde MDA, GSH ve nitrik oksid düzeylerine bakılmış ve doku örnekleri aynı zamanda histopatolojik düzeyde incelenmiştir. Bu çalışmada sigara dumanı ile birlikte resveratrol verilen grupta sadece sigara verilen gruba göre MDA seviyesinde belirgin düşüş gözlenmiştir. Çalışmanın sadece sigara dumanına maruz bırakılan grubunda ise GSH seviyesinde anlamlı bir düşüş ve sigara ile birlikte resveratrol verilen gruptaki GSH seviyesinde ise artış görülmüştür. Bu bulgular eşliğinde sigara dumanına maruz kalan sıçanların testisinde oksidatif stresin olduğu ve resveratrolün direkt veya dolaylı antioksidan etkisiyle bu hasarı önlemede etkili olduğu kanısına varılmıştır (Söylemez et al 2011).

Ehrlich asit tümörü enjekte edilmiş farelerde, koruma ve tedavi amaçlı olarak kekik ve taurin uygulamalarının araştırıldığı bir çalışmada böbrek dokusunda oksidan stresin göstergesi olarak MDA ve AOPP düzeylerinin tedavi gruplarında düştüğü, antioksidan enzim olan GSH ve SOD düzeylerinde ise yükselme olduğu gözlenmiştir (Sarı 2008).

Sigara dumanının solunmasıyla oluşan testis hasarına karşı gavaj yoluyla verilen bal desteğinin antioksidan olarak koruyucu etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada; sigara dumanı solutulan grupta MDA ve glutatyon peroksidaz

seviyesinin arttığı; total antioksidan statüsü ve SOD seviyesinin ise azaldığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda bal desteğinin sigara dumanının sıçan testisinde yarattığı oksidatif stres ve hasar üzerine koruyucu bir etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir (Mahaneem, Siti Amrah, Hasnan and Kuttulebbai 2011)

Çalışmamızda oksitosinin antioksidan etkisini incelemek amacıyla biyokimyasal düzeyde kanda MDA, GSH ve AOPP düzeyleri incelenmiştir. STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturduğumuz grupta kan MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) artış gözlenmiştir. MDA düzeyindeki bu artışla bağlı olarak STZ enjeksiyonunun testiste oksidatif hasara yol açtığını düşünmekteyiz.

Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA seviyelerinin çalışmamıza ait tüm deney gruplarında incelenmesi sonucu oksitosin ön uygulama grubunda MDA seviyesinde STZ ve oksitosin tedavi grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda antioksidan belirteci olan GSH seviyeleri incelendiğinde STZ grubunda GSH seviyesinde anlamlı ($p<0,001$) bir azalma olduğu belirlenirken, oksitosin ön uygulama ve tedavi grubunda ise GSH seviyelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

İleri oksidasyon aracılı protein hasar belirteci olan AOPP düzeyini gruplar arası incelediğimizde; oksitosin ön uygulama ve oksitosin tedavi grubunda, AOPP düzeyinde anlamlı bir ($p<0,001$) azalma olduğu gözlenmiştir. Diyabetin yansıması olarak gözlemlediğimiz yüksek glukoz düzeyinin oluşturduğu oksidatif strese karşı oksitosin antioksidan bir etki göstererek, serbest oksijen radikallerinin oluşumunun azalmasında etkin olmuştur. Bu bulgular eşliğinde oksitosinin oluşturmuş olduğu antioksidan savunma mekanizmasıyla diyabete karşı hücre koruyucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Bir diğer çalışmada, farelere 100 mg/kg STZ enjeksiyonu yapıldıktan 2 ve 4 hafta sonra testis dokusu ince yapısı incelenmiştir. STZ enjeksiyonundan 2 hafta sonra testiste çok belirgin değişiklikler gözlenmezken; STZ enjeksiyonundan 4 hafta sonra özellikle Leydig hücrelerinde belirgin değişiklikler olduğu ifade edilmiştir. Bu hücrelerde STZ enjeksiyonu sonrası beklenen sürenin artmasına bağlı olarak lipid damlacığı sayısının arttığı, buna

karşın düz yüzlü endoplazmik retikulum sayısının azaldığı bildirilmiştir. Birçok alanda da dejenere olmuş spermatogenik seriye ait hücrelerin varlığı dikkati çekmiştir (Sanguinetti, Ogawa, Kurohmaru and Hayashi 1995). STZ ile oluşturulan diyabetli hayvanların testislerindeki hasarın geçirimli elektron mikroskopisi düzeyinde incelendiği diğer bir çalışmada; mayoz bölünme sonrası oluşan spermatidlerde baş bölümlerinde harabiyeti yansıtır akrozomal bozukluklar, binuklear spermatidler ve kuyruk bölümlerinde deformasyonlar gösterilmiştir (Gürsu, Aytekin, Anıl ve Erbenği 1989).

Geçirimli elektron mikroskopik incelemelerimizde de ışık mikroskopik bulgularımıza paralel olarak STZ grubunda, seminifer tübül epitelinde ayrılmalar, spermatozoonlarda yapısal bozukluk ve spermatogonyumlarda yoğun hasar olduğu görülmüştür. Buna ilaveten tübül bazal laminanın ve hücreler arası sıkı bağlantı bölgelerinin hasarlı olduğu ve sıkı bağlantı bölgelerinin hemen altındaki spermatogenik seriye ait hücre sitoplazmalannda vakuollerin oluştuğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, gruplar arası kıyaslama yapıldığında oksitosin ön uygulama grubunda ince yapısal düzeydeki doku hasarının en alt seviyede ve normal morfolojiye benzer olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz tüm bu bulgulara göre deneysel diyabet, infertiliteye sebep olabilen önemli etkenlerden biri olarak bilinmekte olup, testis ağırlığının azalması eşliğinde, spermatogenik seri hücrelerde dejenerasyona ve genel olarak seminifer tübüllerde atrofiye neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara dayanarak, antioksidan bir madde olarak kabul edilen oksitosinin bu çalışmada STZ ile oluşturulan deneysel diyabette koruyucu ve tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Oksitosinin uygulamaları karşılaştırıldığında koruyucu etkisinin tedavi edici etkisinden anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmanın bulgularına dayanarak, Türkiye'de büyük bir popülasyonda görülen diyabete bağlı olarak gelişen erkek infertilitesinin önlenmesinde oksitosin uygulamasının klinik tedaviye katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Abdolahnejad A, Gol A, Dabiri S. (2009). Garlic effects on reproductive complications of diabetes mellitus in male rats. *Physiol and Pharmacol*, 13(3): 297 -307.
2. AltanN, DinçelAS, Koca C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Derg*, 31 (2): 51-56.
3. Anderson JE, Thliveris JA.(1987). Morphometry and cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat*, 180(1): 41- 48.
4. Assinder SJ, Rezvani A, Nicholsan HD.(2002).Oxytocin promotes spermiation and sperm transfer in the mouse. *IntJAndrol*, 25(1): 19-27.
5. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N EnglJ Med*, 332:281-285.
6. Avcı A. (2001). Diyabet oluşturulmuş ratlarda böbrek antioksidan savunma sistemi ve E vitaminin etkileri. Ankara Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, (Danışman: Doç.Dr. O Canbolat).
7. Aytekin Y, Aykaç İ, Beler B, Erben T. (1987). Diyabetik testiste Leydig ve Sertoli hücreleri. *Türk Üroloji Derg*, 13(1): 33-41.
8. Azza IO, Mohamed AE, Khaled MK, Aml AE.(2012). Alfa-Lipoic acid protects testosterone secretion pathway and sperm quality against 4-ter octylphenol induced reproductive toxicity. *Ecotoxicology and Enviromental Safety* ,81: 76-83.
9. Baccetti B, Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, LeoV. (2002). Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod*, 17: 2673 2677.
10. Bolzan AD, Bianchi MS. (2002) Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*, 512: 121-13.
11. Bu T, JiaY, Lin J, Mi Y, Zhang C. (2012). Alleviative effect of quercetin on germ cells intoxicated by 3-methyl-4-nitrophenol from diesel exhaust particles. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 13(4):318-326.
12. Caprio M, Fabbrini E, Ricci G, Basciani S, Gnessi L, Arizzi M, Carta AR, De Martino MU, Isidori AM, Frajese GV, Fabbri A. (2003). Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *BiolReprod*,68(4): 1199-1207.

13. Contuk G.(2009). Vazektomi Sonrası Sıçan Testisinde Meydana Gelen Değişikliklerin İncelenmesi: Morfoloji, Hücre Ölümü ve Okludin Dağılımı. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman, Prof. Dr. F Ercan).
14. Contuk G, Orun O, Ekşioğlu E, Ercan F. (2012). Morphological alterations and distribution of occludin in rat testes after bilateral vasectomy. *Açta Histochem*, 114:244-251.
15. Duridanova DB, Nedelcheva MD, Gagov HS. (1997). Oxytocin induced changes in single celi K⁺ currents and smooth muscle contraction of guinea-pig gastric antrum. *Eur JEndocrinol*, 136:531-538.
16. Erkanlı G. (2008). Radyasyon ve Yüksek Isı Uygulamasının Sıçan Testis Morfolojisi, Hücre Ölümü ve Kan Testis Bariyeri Üzerine Etkileri: İnfertilite Açısından Değerlendirme. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman, Prof. Dr. F Ercan).
17. Frayne J, Townsend D, Nicholson HD. (1996). Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat. *J Reprod Ferti*, 107 (2): 299-306.
18. Gimpl G, Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev*, 81: 629-683.
19. Golalipour MJ, Balajadeh BK, Ghafari S, Azarhosh R, Khori V. (2011). Protective effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) on morphometric and morphologic alterations of seminiferous tubules in STZ diabetic rats. *JBiolSci*, 14(5): 472-477.
20. Guneli E, Tuğyan K, OzturkH, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N.(2008). Effect of melatonin on testicular damage in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur Surg Res*, 40: 354-360.
21. Gürsu S, Aytakin Y, Anıl YD, Erbeni T. (1989). Diabetli sıçan testislerinde elektron mikroskopik ve ³H- Thymidin ile otoradyografik bulgular. *Türk Üroloji Derg*, 15(3): 423-431.
22. Hess RA, Linder RE, Strader LF, Perreault SD.(1988). Acute effects and long term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat II. quantitative and qualitative histopathology of the testis. *JAndrol*, 9: 327- 342.
23. Hideki S, Yuji K. (2002). Characterization and Expression of Oxytocin and the Oxytocin Receptor. *Mol GenetMetab*, 71: 552-558.
24. Ishii S, Kamegal J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Okawa S. (2002). Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetichyperphagia. *Endocrinology*, 143(12): 4934-4937.

25. İrer SV, Alper G.(2004). Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2(3): 127-136.
26. Junqueira LC, Carneiro J. (2006). Temel Histoloji. Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 431-47.
27. Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K. (1991). Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int JExp Pathol*, 72: 1-7.
28. Kanter M, Aktas C, Erboğa M. (2012). Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol*, 50: 719-725.
29. Kapucu A. (2006). Normal ve Diyabetik Sıçanlarda Leptin Uygulanmasının Testis Üzerine Etkisi ve Nitrik Oksit (NO) ile Olan İlişkisi. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, (Danışman, Yar. Doç.Dr. K Dar).
30. Khaki A, Nouri M, Fathiazad F, Ahmadi-Ashtiani HR, Rastgar H, Rezazadeh SH. (2009). Protective Effects of Quercetin on Spermatogenesis in Streptozotocin Induced Diabetic Rat. *Journal of Medicinal Plants*, 8(5): 57-64.
31. Koca N, Karadeniz F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Derg.* 35: 32-37.
32. Koh PO. (2007). Streptozotocin-induced Diabetes Increases Apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *J. Vet. Med. Sci*, 69(9): 969-971.
33. Kovacs GL, Sarnyai Z, Szabo G. (1998). Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinol*, 23(8): 945-962.
34. Larsen WJ. (1997). Human Embryology. Churchill Livingstone, Second Edition, New York, p.373-388.
35. Lee J, Macbeth AH, Pagani J, Scott W. (2009). Oxytocin: the Great Facilitator of Life. *Prog Neurobiol*, 88(2): 127-151.
36. Mahaneem M, Siti Amrah S, Hasnan J, Kuttulebbai Nainamohamed SS.(2011). Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats. *Int. J. Mol. Sci*, 12: 5508-5521.
37. Marieb EN. (2001). Human Anatomy and Physiology, 5th edition, Benjamin Cummings, San Francisco, p.567-588.
38. Mergel D, Andermann G, Andermann C. (1979). Simultaneous spectrophotometric determination of oxidized and reduced glutathione in human and rabbit red cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1(5): 277-83.
39. Monstein HJ, Grahn N, Truedsson M, Ohlsson B.(2004). Oxytocin and oxytocin-receptor mRNA expression in the human gastrointestinal tract: a polymerase chain

- reaction study. *RegulPept*, 119: 39-44.
40. Moore K, Persaud TVN. (2002). Çeviri Editörleri: Yıldırım M, Okar İ, Dalcık H, İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, s.323-333.
 41. Mohasseb M, Ebied S, Yehia M, Hussein NT.(2011). Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem*, 61 (2): 185-194.
 42. Nicholsan HD, Guldenaar SEF, Boer GJ, Pickering BT. (1991). Testicular oxytocin effects of intratesticular oxytocin in the *mt.JofEndoc*, 130: 231-238.
 43. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2):351-8.
 44. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. (2002). Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *JMedSci*, 22: 173-178.
 45. Park JM. (2007). Wein: Campbell-Walsh Urology, 9th ed. Section XVII- Pediatric Urology, Chapter 106-Normal Development of the Urogenital System.657-684.
 46. Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. (2009). Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia*, 41: 361-368.
 47. Ross HM, Romrell JL. (2006). Histology: A text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd edition. p 603-625.
 48. Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG. (2011). The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Celi Physiol Biochem*, 28: 887-898.
 49. Sadler TW. (2005). Langman Medikal Embriyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
 50. Sanguinetti RE, Ogawa K, Kurohmaru M, Hayashi Y.(1995). Ultrastructural changes in mouse Leydig cells after Streptozotocin administration. *Exp Anim*. 44(1):71- 73.
 51. San S.(2008). Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör Modelinde Thymus Sipyelus ve Taurinin, Böbrek MDA, Glutasyon, AOPP Düzeylerine ve S OD Akti vitesine Etkileri. G.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara,(Danışman: Prof.Dr. N Kılıç).
 52. Sharpe RM.(2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *PhilosTrans R Soc B. BiolSci*, 365:1697-1712.
 53. Söylemez H, Uğraş MY, BeyturA, Oğuz F, Kuruş M, Karabulut AB. (2011). Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda resveratrolün testis dokusundaki

- antioksidan etkisinin değerlendirilmesi. *Türk Üroloji Derg* 37(3):235-241.
54. Szkudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the ratpancreas. *Physiol Res*, 50: 536-546.
55. Tang XY, Zhang QZ, Dai DZ, Ying HJ, Wang QJ, Dai Y.(2008).Effects of strontium fructose 1,6-diphosphate on expression of apoptosis-related genes and oxidative stress in testes of diabetic rats. *IntJ Urol*, 15: 251-256.
56. Thackare H, Nicholson HD, Whittington K. (2006). Oxytocin its role in male reproduction and new potential therapeutic uses, *Hum Reprod Update*, 12 (4): 437-448.
57. Tunçdemir M. (2006). STZ-Diabetik Sıçanlarda Ace İnhibitörü ve Angiotensin Reseptör Blokerinin Böbrek Dokusunda Clusterin ve Apoptoz Üzerine Etkileri. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman, Prof. Dr.M Öztürk).
58. Uvnas-Moberg K. (1998). Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psycho neuro endocrinology*, 23(8): 819-835.
59. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B.(1996) Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uremia. *Kidney M*, 49 (5): 1304-1313.
60. Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, Comhaire FH, Aganval A.(2004). Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *AsianJAndrol*, 6: 313-318.

9. ETİK KURUL ONAYI



MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI ETİK KURULU

mjlUtlGİ.tHİ	1 ntoTOKGi, uHTi	55.2011 mar
	remi MU	Sunulmuş / İnceleme / Değerlendirme / Karar / Uygulama / İzleme / Değerlendirme / Yürürlük / İnceleme / Değerlendirme / Karar / Uygulama / İzleme / Değerlendirme
	PKJMIJAKV'İ F'İ T'İ NV: N: M)I	Yatırımların, Kurumların, Kurumların
	İMMHFM<* M	Asıl Kurul / Yerel Kurul / İnceleme Kurulu / Değerlendirme Kurulu / Karar Kurulu / Uygulama Kurulu / İzleme Kurulu / Değerlendirme Kurulu
	İH-Sit-ki.EVÜ :	İhale / İnceleme / Değerlendirme / Karar / Uygulama / İzleme / Değerlendirme

KARAR BİLGİLERİ	km Ha 55.2011.mar	Janlı 20.11.2011
	Yukarıda belirtilen konularla ilgili olarak, Etik Kurulunun 20.11.2011 tarihinde yapılan toplantısında, aşağıda belirtilen kararlar alınmıştır. O kararlar aşağıdaki gibidir. Etik Kurulunun 20.11.2011 tarihinde yapılan toplantısında, aşağıda belirtilen kararlar alınmıştır. O kararlar aşağıdaki gibidir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Denetim, inceleme, araştırma, raporlama, değerlendirme, karar alma, uygulama, izleme, değerlendirme, raporlama, değerlendirme, karar alma, uygulama, izleme, değerlendirme

ÜYELER	Uzmanlık Dalı	Kurumun Adı / Yöresi	Okuydu mu / Okunmadı mı	Toplantıya Katıldı mı / Katılmadı mı	İmza		
Prof. Dr. Bekir YÜĞEN	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Prof. Dr. Zafer GÖREN	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Prof. Dr. Göknel ŞENER	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Doç. Dr. Halil TUĞTEPE	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Yerel Kurul Üyesi	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Öğr. Gör. Dr. Gürkan SERT	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Baş. Arif GUMUŞ	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]
Bilir AYGÖR	Var	Yok	Evet	Hayır	[İmza]

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Pınar	Soyadı	Köroğlu
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	29.04.1988
Uyruğu	T.C.	Tel	0536 706 47 34
E-mail	pnnar88@hotmail.com, pinar.koroglu@acibadem.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD	2012
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Hücre ve Moleküler Biyoloji Kümesi	2010
Lise	Haydarpaşa Anadolu Lisesi	2006

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	73	70	70

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Stajlar/görevler:

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD 'daki histoloji ve embriyoloji teorik ve pratik dersleri (2010- 2012)

Yeditepe Üniversitesi Hastanesi (Temmuz- Eylül 2008)

- Tüp Bebek Merkezi
- Kemik İliği ve Transplantasyon Ünitesi, Kan Bankası
- Merkez Laboratuvarları - Biyokimya, Mikrobiyoloji

Dernek Üyelikleri:

Türk Elektron Mikroskopi Derneği

European Microscopy Society

International Federative Societies of Histochemistry and Cytochemistry

International Federative Societies of Microscopy

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

World federation of travel journalists & writers (Aturjet)

Kongreler:

3. Ulusal Onkoloji ve Hematoloji Kongresi (3-5 Nisan 2009) (Yeditepe Üniversitesi)

İstanbul Üniversitesi Disiplinlerarası Fen Kongresi (14-16 Mayıs 2010, İstanbul)

20.Ulusal Elektron Mikroskopisi Kongresi (25-28 Ekim 2011, Antalya)

15. Avrupa Mikroskopi Kongresi (16-21 Eylül 2012, Manchester)

Katıldığım sertifika programları:

Marmara Üniversitesi deney hayvanları merkezi (DEHAMER) deney hayvanları kullanımına ait sertifika (21 Şubat-4 Mart 2011)

İstanbul Tıp Fakültesi hücre kültürü sertifika programı (8-9 Eylül 2011)

Mikroskop Okulu (20.ulusal elektron mikroskopi kongresi, 24 Ekim 2011)

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AbD "new technologies in clinical proteomics" temel kursu (31-1 Ocak 2012)

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler:

- Köroğlu P, Şentürk Erkanlı G, Yücel D, Arbak S: Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabette ekzojen olarak uygulanan oksitosinin sıçan testisi üzerine olan etkisinin histopatolojik açıdan değerlendirilmesi.il. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi poster sunumu, Pamukkale/Denizli, 16-19 Mayıs 2012.
- Koroglu P, Senturk Erkanli G, Yücel D, Tansoker MI, Canturk MM, Arbak S:Histopathological evaluation of exogenous oxytocin on Streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. 15. Avrupa Mikroskopi Kongresi, Manchester/İngiltere, 16- 21 Eylül 2012.

Ödüller ve burslar:

Avrupa Mikroskopi Kongresine Burs Desteği (International Federation of Societies for Microscopy,IFSM Genç Araştırmacı Bursu) (15. Avrupa Mikroskopi Kongresi, Manchester/İngiltere, 16- 21 Eylül 2012)

Sempozyumlar, Seminerler:

- Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi , Floresan yöntemlerin biyoloji ve tıpta uygulamaları (5Kasım2010).
- İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AbD (diyabet ve komplikasyonlannda apoptozun yeri, 26 Kasım 2010).
- Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi nanotıp uygulamaları: kanser,kök hücre,yaşlanma sempozyumu (13 Aralık 2010).
- Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi adli patoloji semineri (15 Aralık 2010)
- Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi biyomalzemeler sempozyumu (16 Aralık 2010).
- Boğaziçi Üniversitesi ,Moleküler biyoloji ve genetik bölümü,(James Watson, DNA 18 Nisan 2011).
- Koç Üniversitesi,Tıp Fakültesi (proteinlerin elektron mikroskobisinde gösterimi, Doç.Dr.Ranan Gülhan Aktaş, 29 Nisan 2011).
- İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi (akademik duruş, Prof.Dr.Ramazan Demir (13Mayıs2011).
- Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi ,histoloji ve embriyoloji anabilim dalı sunumları (27Mayıs 2011).
- Acıbadem Üniversitesi proteomiks sempozyumu (2 Haziran 2011).
- İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AbD (Vitamin D ve Alzheimer ilişkisini nöron hücre kültürü ile saptamak, 2 Aralık 2011).
- Acıbadem Üniversitesi anatomi-anestezi günleri (Pleksus brakialise multidisipliner yaklaşım) (9 Aralık 2011).
- Acıbadem Üniversitesi temel bilimler semineri (Bağışıklık sistemi hücrelerine disiplinlerarası bakış, 11Ocak 2012,Yar.Doç.Dr. Devrim Öz Arslan).
- Acıbadem Üniversitesi temel bilimler semineri (Biyomakromolekül fonksiyonu geliştirmede mekanistik yaklaşımlar, 25Ocak 2012, Yar.Doç.Dr.Özge Can).

- Acıbadem Üniversitesi temel bilimler semineri ("microRNA, siRNA", 7 Mart 2012 Prof.Dr.Tanıl Kocagöz).
- Namık Kemal Ü. Tıp Fakültesi histoloji ve embriyoloji AbD, Tekirdağ (6 Nisan 2012, Yrd. Doç. Dr. Cevat Aktaş -Diabetik rat testisinde apoptozis ve oksidatif strese karşı quercetin'in koruyucu etkileri, Uzm. Bio. Mustafa Erboğa -Deneysel olarak oluşturulan koledok kanal tıkanıklığı sonrası gelişen karaciğer hasarına karşı kafeik asit fenil esterinin (CAPE) koruyucu etkisi).
- İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AbD (Prof.Dr.Belgin Can, Böbrek hastalıklarında transmisyon elektron mikroskopunun tanı değeri) (Prof.Dr.Oya Evirgen, Periferik sinir hastalıklarında ve çalışmalarında transmisyon elektron mikroskopunun tanı değeri ve stereolojik yöntemler, 13 Nisan 2012).
- Klinik Embriyoloji Derneği, Eurofertil Tüp Bebek Merkezi (embriyoloji kursu, 17 Nisan 2012, time-lapse embryo görüntüleme sistemleri).
- Acıbadem Üniversitesi Temel Bilimler Semineri (Tıbbi Biyokimya AD öğretim üyesi Doç. Dr. Tamer İnal, 18 Nisan 2012 Çarşamba günü, "Toplam Kalite Yönetimi").
- Marmara Üni. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Öğr. Gör. Dr. Dilek Akakın, 27 Nisan 2012 "Kindling uyarısı alan genetik absans epileptik sıçanlarda (GAERS) ince yapısal GABA immünohistokimyası'.
- Kocaeli Ü. Mühendislik Fakültesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü (Ortak sunumları -malzeme mühendisliği alanındaki SEM (taramalı elektron mikroskopu) uygulamaları, biyoloji alanındaki SEM uygulamaları, kök hücre ve doku mühendisliği alanındaki SEM uygulamaları, malzeme mühendisliği alanındaki SEM uygulamaları - 4Mayıs 2012).