

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİABETİK VE NON- DİABETİK FARE TESTİSİNDE OKSİTOSİN
RESEPTÖRÜNÜN İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU VE
PCR İLE GEN EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Biyolog Ayşe AYDOĞAN

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali BİNGÖL

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS 2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİABETİK VE NON- DİABETİK FARE TESTİSİNDE OKSİTOSİN
RESEPTÖRÜNÜN İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU VE PCR İLE
GEN EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ**

Biyolog Ayşe AYDOĞAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali BİNGÖL

Bu çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2015-TS-67

KARS 2017

TC

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Programı çerçevesinde Ayşe AYDOĞAN tarafından hazırlanmış olan **”Diabetik ve non- diabetik fare testisinde oksitosin reseptörünün immunohistokimyasal lokalizasyonu ve PCR ile gen ekspresyonunun incelenmesi”** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmenliği uyarınca değerlendirilerek oy *birliği*..... ile *kabul* edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: *01.06.2017*

Adı Soyadı:

İmza:

Başkan: *Prof. Dr. Nevri İERÇİZ*

Üye: *Prof. Dr. Şahin ASLAN*

Üye: *Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali BANGÖZ*

Nesibe
[Signature]
[Signature]

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR.....	V
TABLO DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÖNSÖZ.....	IX
ÖZET.....	X
SUMMARY.....	XI
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Diabetes Mellitus.....	2
2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi.....	3
2.1.2. Diabetes Mellitus'un Tanı ve Sınıflandırması.....	4
2.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	4
2.1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	6
2.1.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus.....	6
2.1.2.4. Pre-diabet.....	7
2.1.2.5. Diğer Spesifik Tipler.....	7
2.1.3. Diabetes Mellitus Komplikasyonları.....	7
2.2. Deneysel Diabet Modelleri.....	8
2.2.1. Streptozotocin.....	8
2.3. Testis.....	9
2.3.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi.....	9

2.3.2. Testisin Anatomisi.....	10
2.3.3. Testisin Histolojisi.....	11
2.4. Diabetes Mellitus ve Testis.....	13
2.5. Oksitosin Hormonu.....	14
2.5.1. Oksitosinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi.....	15
2.5.2. Oksitosin Pankreas ve Şeker Metabolizması Üzerine Etkisi.....	16
2.6. Oksitosin Reseptörü.....	17
2.6.1. Oksitosin Reseptörü Yapısı.....	17
2.6.2. Oksitosin Reseptörünün Gen Yapısı.....	18
3.MATERYAL ve METOT.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Deney Hayvanı Materyalinin Temini ve Barındırılması.....	19
3.2. Metot.....	19
3.2.1.Deney Gruplarının Oluşturulması.....	19
3.2.2. Diabet Oluşturulması.....	20
3.2.2.1.STZ Solüsyonunun Hazırlanması.....	20
3.2.2.2. Sodyum Sitrat Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	20
3.2.3. Ağırlık Ölçümlerinin Yapılması.....	21
3.2.4. Kan Şekeri Seviyelerinin Belirlenmesi.....	21
3.2.5. Doku Örneklerinin Alınması.....	21
3.2.6. Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması.....	22
3.2.7. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	22

3.2.8.RT-PCR ile Gen Ekspresyonu.....	23
3.2.8.1. RNA İzolasyonu.....	23
3.2.8.2. RNA'ların Spektrofotometrede Ölçümü.....	24
3.2.8.3. Komplementer DNA (cDNA)'nın Üretimi.....	25
3.2.8.4. DNA'nın Çoğaltılması.....	25
3.2.8.5. Örneklerin Jelde Yürütülmesi.....	26
3.2.9. İstatistiksel Analizler.....	27
4.BULGULAR.....	28
4.1. Canlı Ağırlığı.....	28
4.2. Testis Ağırlığı.....	29
4.3. Tubulus Seminiferus Kontortus Çapı.....	29
4.4. Kan-Glikoz Değeri.....	30
4.5. Histolojik Değerlendirme.....	31
4.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	35
4.7. Moleküler Analiz.....	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	43
6. KAYNAKLAR.....	49
7. ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	: Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ANP	: Atrial Natriüretik Peptit
AVP	: Arjinin Vazopressin
bç	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) Deoksiribonükleik Asit
DAB	: Diaminobenzidin
Dk	: Dakika
DI	: decilitre
dNTP	: Deoksinükleosid Trifosfat
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
FSH	: Folikul Stimule Edici Hormon
g	: gram
GDM	: Getasyonel Diabet
GnRH	: Gonadotropin Salıverici Hormon
HCl	: Hidrojen Klorür
HLA	: Human Leucocyte Antijen
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H.E.	: Hematoksilen Eosin
i.p.	: İntraperitoneal
i.v.	: İntra venöz
LH	: Luteinleştirici Hormon
M	: Molar
MHC	: Major Histocompatibility
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit

MSH	: Melanosit Uyarıcı Hormon
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
NF	: Nuclease Free
OT	: Oksitosin
OTR	: Oksitosin Reseptörü
PAS	: Periyodik Asit Shift
PBS	: Fosfat Buffer Salin
RNA	: Ribonukleik Asit
RT-PCR	: Reverse Transkription- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	: Standart Sapma
STZ	: Streptozotocin
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris Borate EDTA (buffer)
TEA	: Transmembran Etki Alanı
TDF	: Testis Belirleyici Faktör
UV	: Ultra Viyole
V	: Volt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo 1. Deney grupları ve yapılan uygulamalar.	20
Tablo 2. DNA örneklerine uygulanan PCR programı.	26
Tablo 3. DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan primerler.	26
Tablo 4. Grupların grup içinde 1. ve 30.gün canlı ağırlık karşılaştırması.	28
Tablo 5. Gruplar arasında 30. günde sağ testis ağırlığı karşılaştırması.	29
Tablo 6. Gruplar arasında 30.günde sol testis ağırlığı karşılaştırması.	29
Tablo 7. Gruplar arasında seminifer tubul çaplarının karşılaştırılması.	30
Tablo 8. Gruplar arası kan glikoz değerlerinin karşılaştırılması.	30
Tablo 9. Testisteki yapılar ve OTR reaksiyon yoğunluğu.	39
Tablo 10. OTR geni RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması.	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 1. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama.	31
Şekil 2. Deneme grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama.	32
Şekil 3. Sham grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama.	32
Şekil 4. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H&E.	33
Şekil 5. Deneme grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H&E.	33
Şekil 6. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. PAS boyama.	34
Şekil 7. Diabet grubu testis dokusunun histolojik görünümü. PAS boyama.	35
Şekil 8. Kontrol grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi.	36
Şekil 9. Sham grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi.	36
Şekil 10. Diabet grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi.	37
Şekil 11. Diabet grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi.	38
Şekil 12. Kontrol grubu negatif OTR immunoreaktivitesi (Negatif kontrol).	40
Şekil 13. PCR Jel görüntüleri	41

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali BİNGÖL'e, eğitimim ve araştırmam süresince benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Şahin ASLAN, Prof. Dr. Nesrin ÖZFiLİZ, Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI, Doç. Dr. Turgay DEPREM, laboratuvar çalışmalarında desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Serap KORAL TAŞÇI ve PCR'ın tüm aşamalarındaki desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e, ayrıca sağladığı finansmandan ötürü Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne, aynı zamanda bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve son olarak tez dönemim boyunca bana destek olan arkadaşlarım Naim ESİM, Aycan CANLI ve Ekrem LÜLECİ'ye teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışma, diabetik ve non-diabetik fare testisinde oksitosin reseptörünün immunohistokimyasal lokalizasyonunun ve RT-PCR ile gen ekspresyonunun incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma için deney hayvanı olarak 2 aylık 18 adet Balb-c cinsi erkek fare kullanıldı. Deney grupları; Kontrol, Sham ve Diabet grubu olarak belirlendi. Diabet grubuna i.p yolla STZ enjeksiyonu yapılarak diabet oluşturuldu. Sham grubuna sodyum sitrat çözeltisi i.p olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir uygulama yapılmadı. STZ uygulamasından 30 gün sonra farelerden eter anestezi altında servikal dislokasyon yapılarak testis dokuları alındı. Alınan sağ testis dokuları rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafinde bloklanıp kesitler alındı. Alınan kesitlere histolojik olarak incelenmek için H&E, PAS ve Crossman'ın üçlü boyaması yapıldı. OTR'nin immunoreaktivitesini belirlemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) metodu uygulandı. Alınan sol testis dokuları ise RT-PCR analizleri için kullanıldı. Deney süresi bitiminde, grupların canlı ağırlıkları, kan glikoz seviyesi, testis ağırlıkları, tubulus seminiferus kontortus çapları, testis doku örneklerinde OTR'nin immunohistokimyasal lokalizasyonu, OTR'nin ekspresyon seviyesi ve testisin histolojik yapısı karşılaştırıldı. DM grubunda ilk ve son gün canlı ağırlığı karşılaştırıldığında son gün canlı ağırlığında azalma olduğu belirlendi. Diabet grubunda tubulus seminiferus kontortusunun ortalama çapının kontrol ve sham grubuna göre daha kısa olduğu belirlendi. Histolojik incelemeler sonucunda diabet grubunda diğer gruplardan histolojik açıdan belirgin bir fark olmadığı tespit edildi. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda, sham ve kontrol gruplarında OTR'nin benzer özellikte immunoreaktivite gösterdiği, immunoreaktivitenin sadece Leydig hücrelerinde olduğu görüldü. Diabet grubunda ise OTR immunoreaktivitesinin yine leydig hücrelerinde olduğu ancak diğer gruplara göre OTR immunoreaktivitesini zayıf olduğu görüldü. RT-PCR ile belirlenen OTR ekspresyonunda, diabet grubunda kontrol ve sham gruplarına göre azalma olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Diabet, İmmunohistokimya, Oksitosin, Oksitosin Reseptörü , RT-PCR ve Testis

SUMMARY

The aim of this study was to determine OTR gene expression and localization, respectively, by RT-PCR and immunohistochemical techniques in diabetic and non-diabetic mice testis. In this study, 18 male Balb-c mice at 2 month of age were used. Animals was divided into three groups: diabetic, sham and control groups. STZ was applied to diabetic group via i.p. injection to induce diabetes. Sodium citrate was applied to sham group via same way. Nothing was applied to control group. The testis tissues were taken 30 days after STZ injection by cervical dislocation under anesthesia. Right testis tissues were passed through routin histologic process, blocked in parafin and taken section from them. These sections were stained with H&E, PAS and Crossman's triple techniques to examine histological. Avidin-Biotin-Peroxidase metod was applied to determine OTR immunoreactivity. Left testis tissues were used for RT-PCR analysis. The histologic structure of testis, the body weight, blood glucose level, the diameter of tubulus seminiferous contortus, immunohistochemical localization of OTR and expression levels of OTR gene in testis were compared among groups. It was found that the body weight decreased in diabetic group when the weight value of those days were compared. The diameter of tubulus seminiferous contortus was shorter than those of other groups. There was no obvious difference with regard to histologic appearence among groups. The results of immunohistochemical examination showed that OTR immunoreactivity was strong in control and sham groups and weak in diabetic group, and it was seen only in Leydig cells. OTR gene expression was lower in diabetic group than those of other groups.

Key Words: Diabet, Immunohistochemistry, Oxytocin, Oxytocin Receptor, RT-PCR and Testis.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM); Pankreasın endokrin kısmındaki β hücreleri tarafından üretilen insülinin yetersiz salgılanması ya da etkisindeki azalmayla ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır (Kök 2011).

Diabet; akut (poliüri, polidipsi vb.) ve kronik (noropati, nefropati, infertilite, kardiyovasküler bozukluklar vb.) komplikasyonlarıyla birçok organ hasarına yol açtığı gibi bu bozuklukları ilerlemesiyle morbidite ve erken mortalite riskini arttıran organ kayıplarına da neden olabilen bir hastalıktır (Rodrigues 1999). DM'nin dünya genelinde en yaygın görülen hastalıklardan biri olduğu bilinmektedir. 2005 yılında yapılan araştırmalara göre dünya genelinde 230 milyon insan bu hastalıktan etkilenmiştir. Prevalansı sürekli artış gösteren diabetin 2035 yılında 382 milyon insanı etkileyeceği düşünülmektedir (<http://www.idf.org/diabetesatlas> Erişim tarihi: 10.12.2016).

Oksitosin (OT) 9 amino asitten (glycine, gluamine, leucine, proline, cyteine, tyrosine, isoleucine, asparagine ve cyteine) oluşan ve arka hipofizden salgılanan peptid yapılı bir hormondur. Oksitosinin; bellek, stres, ağrı duyusu, timüs, bağışıklık sistemi, kemik gelişimi, kalp-damar sistemi, üreme, pankreas-şeker metabolizması ayrıca beslenme, çiftleşme, doğum, annelik duygusu gibi davranışlar ile ilgili olduğu bilinmektedir. OT'nin etki edeceği hücrelerin yüzeyinde bulunan transmembran OTR'ye bağlanması ve çeşitli hücre içi sinyal yollarının da aktifleşmesiyle OT reseptörü fonksiyonel hale gelir. Bu bağlanma başta uterus kasılmaları olmak üzere birçok hormonal etkinin ortaya çıkmasını sağlar. Oksitosin reseptörü rodopsin tipi sınıf I, G-proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper familyasının VPR alt ailesine bağlı bir reseptördür (Ammar ve ark. 1994).

Bu çalışmada, DM'nin testis dokusundaki OTR'nin gen ekspresyonu, immünoreaktivitesi, lokalizasyonu ve testis dokusunun histolojik yapısı üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus; insülin sekresyonunda azalma ya da insülinin etkisinde bozulmalar sonucu ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bozukluktur. Bu bozukluğun ilerlemesi birçok mikro ve makrovasküler komplikasyonlara (retinopati, nöropati, nefropati, kardiovasküler hastalıklar vb) neden olur (Roth 2007).

Alınan besinler glikoz gibi monomerlerine ayrıştırılır ve bu moleküller ancak insülin yardımıyla hücrelere alınabilir. Pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülinin yetersizliği ya da hiç salgılanmaması sonucu kandaki glikoz hücrelere geçemediğinden kan glikoz değeri yükselir ve hiperglisemi gerçekleşir. DM hastalarında insülin eksikliği organizmanın protein, yağ ve karbohidrattan yeterince yararlanamamasına neden olur (Kök 2011 ve Özkorkmaz 2008). American Diabetes Association (ADA) kriterlerine göre açlık kan şekeri (AKŞ)'nin sağlıklı bireylerdeki değeri 100 mg/dl olmalıdır. AKŞ'nin 126 mg/dl den yüksek olması DM olarak kabul edilmektedir (www.beslenme.gov.tr Erişim tarihi: 20.04.2017).

DM'nin en sık rastlanan belirtileri anormal şekilde açlık hissi ve çok yemek yeme arzusu (polifaji), ağız kuruluğu, çok su içme (polidipsi) ve sık sık idrara çıkmadır (poliüri). İnsülin yetersizliğinden dolayı hücrelere yeterince glikoz giremez ve bunun sonucunda açlık hissi duyulur. Açlıktan kaynaklanan halsizlik, yorgunluk ve zayıflamanın yanı sıra bulanık görme, deri infeksiyonları, yaraların geç iyileşmesi ve baş ağrısı gibi klinik belirtileri görülmektedir (İmamoğlu ve ark. 1995). Ayrıca kan glikoz düzeyinin yükselmesi (hiperglisemi), idrarda glikoz bulunması (glikozüri), derinin kuruması (dehidratasyon) gibi değişiklikler de görülmektedir (Coşkun ve ark. 2005, Rajasekaran ve ark. 2005).

2013 yılında dünya çapında yapılan araştırmalara göre Türkiye 20-79 yaş grubundaki 7 milyon hastayla 3. sırada yer alırken diabet yaygınlığı en yüksek olan

ülkeler arasında % 14.85 oranıyla 1. sırada yer almaktadır (www.idf.org. Erişim tarihi: 10.12.2016).

Türkiye Diabet Epidemiyolojisi (TURDEP)'nin 1997-1998 yıllarında yaptığı çalışmada 24788 kişide diabet prevalansının %7,2 olduğu tespit edilmiştir. 2010 yılında ise 26499 kişide yapılan çalışmada diabet prevalansının %13,2 oranında olduğu görülmüştür. DM vakalarında görülen bu artışlar DM ile ilgili bilimsel çalışmalara duyulan ilginin artmasına neden olmuştur (Satman ve ark. 2002, Satman ve ark. 2013).

2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi

Diabetes Grekçede sifon anlamına gelmektedir. DM hastalarının idrara sık sık gitmelerinden dolayı diabetes sözcüğü kullanılmıştır. Mellitus ise mel sözcüğünden türetilmiştir. Mel grekçede bal anlamına gelmektedir (Sodeman 1992). M.Ö 150 yıllarında erime hastalığı olarak tanımlanan DM'nin ilk tanımı Kapadokyalı Arataeus tarafından yapılmıştır (Hatemi 1996). 1674 yılında Thomas Willis diabetli idrarının sağlıklı insanlara göre tatlı olduğunu tespit etmiştir. 1776 yılında Matthew Dobsoy idrarı kaynatarak şekeri kristalleştirmiş ve idrarda şeker bulunduğunu açıklamıştır. 1977de Pool ve 1978 de Cawley kimyasal olarak çalışmalar yapmış ve idrardaki şekerin glikoz olduğunu ifade etmiştir. 1850 de Lerch idrarda aseton bulunduğunu belirtmiştir. Yine aynı tarihlerde Claude Bernard klinik ve biyokimyasal çalışmalarıyla glikozun karaciğerde depolandığını belirtmiştir. 1889 yılında Minkowski yaptığı çalışmalarla pankreatektomi yapılan hayvanlarda DM'nin ilerlediğini görmüştür. 1922 de Best ve Banting pankreas ekstraktından insülini izole ederek DM tedavisinde çok önemli bir adım atmışlardır. 1926 yılında Frank, Synthalini antibiyotiğini bulmuştur. 1973 yılında Nova ve Leo firmaları tarafından çeşitli antikorlar üretilmeye başlanmıştır. Günümüzde ise DNA teknolojisiyle insülin üretilmektedir (Candeğer 2000).

2.1.2. Diabetes Mellitus'un Tanı ve Sınıflaması

1979 yılında Amerika Diabet Veri Grubu tarafından belirlenen diabet tanı ve sınıflandırma kriterleri 1997 de tarafından yeniden düzenlenmiştir.1999 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) birkaç değişiklik yaparak bu sınıflamayı kabul etmiş ve 2003 yılında yayınlamıştır. Yapılan son revizyonlara göre diabet; Tip 1 DM, Tip 2 DM, spesifik diabet tipleri ve prediabet olarak beş klinik sınıfta incelenmiştir (Başkal 2003). Bu çalışmada Dünya Sağlık Örgütünün sınıflandırma şekli dikkate alınacaktır.

2.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

İnsülin sekresyonuna bağlı olarak gelişen diabet tipidir. Her yaşta görülebilir. Diabet vakalarının %5-10' unu oluşturmaktadır. Jüvenil diabet ya da insüline bağımlı diabet olarakta bilinmektedir. İnsülin sekresyonunun gerçekleştiği pankreasın β hücrelerinin otoimmün aracılıklı yıkımı ve bu hücrelerin harabiyeti sonucu insülinin az salgılanması ya da hiç salgılanamaması ile karakterizedir. İnsülin eksikliğinde dolaşımdaki glikozun hücrelere geçememesi sonucu kanda glikoz ve yağ asitleri birikir. Bu durum hiperozmolarite ve hiperketonemiye sebep olur. Hiperglisemiden kaynaklanan kilo kaybı ve açlık hissi dolayısıyla zamanla çok yemek yeme, ağız kuruluğu, yorgunluk ve halsizlik gibi semptomlar kendini gösterir. Kanda biriken glikoz idrarla atılmaya başlar bu durum ozmotik etkiyle su atılımını artırır ve hasta susama hissiyle fazla miktarda su tüketip sık sık idrara gider (İliçin 1997).

Diabetin bütün türlerinde; çevresel faktörler, yaşam şekli ve genetik yatkınlık hastalığın riskini arttırabilmektedir.

Tip 1 Diabetes Mellitus'u Etkileyen Çevresel Faktörler ve Beslenme: Diabetin oluşması ve gelişmesinde gerek çevresel gerekse genetiksel birçok etken rol almaktadır. DM'ye genetik yatkınlığı olan süt çocuklarında inek sütüne erken başlanması sonucu çocuklarda pankreas beta hücrelerinde bozulmalar meydana geldiğini, dolayısıyla anne sütünün DM riskini oldukça azalttığı belirtilmiştir (Dahl-Jørgensen ve ark. 1991). İnek sütü ile beslenmeye 3 aylık olmadan başlayanlarda Tip 1 diabet görülme sıklığının 1.5 kat kadar arttığı bildirilmektedir (Scott 1996). Tüketilen içme sularındaki nitrat düzeyinin DM ile ilişkili olduğu da belirtilmiştir.

Nitrozamin bakımından zengin olması nedeniyle tütülenmiş et tüketimi de DM'yi etkilemektedir. Organizmaya giren virüsler sitolitik etkilerle beta hücrelerinin harabiyetine sebep olarak diyabetin gelişmesine yol açmaktadır (Yoon ve Jun 2003). Yapılan başka bir çalışmada ise toprağın düşük değerinde çinko içermesi halinde diyabetin görülme sıklığının arttığı da belirtilmektedir (Mac Farlane ve Scott 2003).

Tip 1 Diabetes Mellitus'un Genetiksel Yatkınlığı: Diabetes Mellitus; nesiller boyu farklı genetik bölgelerle aktarılan polijenik bir hastalıktır. İnsan genomunda yirmiden fazla bölgenin Tip 1 diabete etki ettiği bilinmektedir (Bain ve ark 2003). Bu genlerin en önemlileri IDDM 1 ve IDDM 2 genleri olarak bilinmektedir. IDDM 2 kromozom 11p15 üzerinde yer alır ve insülin geni olarak nitelendirilir. IDDM 1 geni ise; spesifik otoimmüniteden sorumlu olan MHC (major histocompatibility) Class II molekülleri ile ilişkilidir. Class II molekülleri 6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p21) HLA (Human Leucocyte Antijen) bölgesinde bulunmaktadır. MHC Class II molekülleri bazı endokrin hücreler ve makrofajların yüzeyinde bulunmaktadır. Bu moleküller antijenik durumlarda yüksek seviyede ekspresyon edilip CD4⁺ T hücre yüzey reseptörü ile birleşerek otoimmün aktivasyonu başlatır. Tip 1 DM'nin HLA antijeni ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bazı HLA antijenlerinin varlığı Tip 1 DM'yi tetiklerken bazı HLA antijenlerinin varlığı da Tip 1 DM'ye direnç oluşturduğu bilinmektedir.

Yapılan çalışmalar Class II moleküllerini ilgilendiren DQB*1, DQA*1 ve DRB*1 gruplarının bir bölümü otoimmün aktiviteyi başlatan ya da hızlandıran bir etken olarak, bir bölümü ise hastalığa direnç oluşturan etken olarak rol oynadığını dolayısıyla Tip 1 diabette etkili olduğunu göstermektedir. HLA-DR3 veya DR4 antijenlerinden herhangi birinin varlığı Tip 1 diabet riskinin 2-3 kat artırırken her ikisinin varlığı bu riski 7-10 kat arttırmaktadır. DQ pozisyonundaki değişikliklerde diabeti etkilemektedir. DQ α zincirinde 52 pozisyonunda arginin bulunması Tip 1 DM yatkınlığına neden olmaktadır. DQB1 grubunda 57 β pozisyonunda aspartik asitin heterozigot yokluğu(non-asp/asp) Tip 1 DM riskini arttırmakta aspartik asitin homozigot yokluğu ise (non-asp/non-asp) Tip 1 diabet riskini 100 kat arttırmaktadır. Tip 1 DM prevalansının o bölgede yaşayan insanlardaki non-aspartik allellerinin frekansı ile orantılı olduğu da yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Tip 1 diabete

yatkınlık "pozitif prediktif değer " (PPV= Hastalıktaki gen sıklığı x Hastalığın popülasyondaki prevalansı / Genlerin popülasyondaki sıklığı) ile anlaşılabilir (Zimmet ve ark 1997, Chiu ve ark 2004).

2.1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 DM; insüline bağlı olarak gelişmez. Karaciğerde glikoz yapımında artma veya insülin direnci ile karakterize edilen metabolik bozukluktur. Genellikle 40 yaş ve sonrasında görülmektedir. Hastalığın görülmesi yaşla doğru orantılı olarak artış gösterir. Ancak obez insanlarda daha sık görülmesi ve son yıllarda obezitenin küçük yaşlarda görülmesi nedeniyle hastalık çocuklarda bile görülmektedir (Chang 2006). Genel diabet vakalarının %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. Hastalığın ilk zamanlarında semptomlar fark edilmez, ancak aşağı yukarı 5 yıldan sonra komplikasyonları fark edilmektedir (The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus 1998).

2.1.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus

1979'da Diabet Veri Grubunun yaptığı tanıma göre GDM; gebelikle başlayan glikoz tolerans bozukluğudur (Metzger 1991). Gebelik sonrasında bu bozukluğun devam etmesi durumunda kişi GDM değil DM olarak kabul edilmektedir. İlk prenatal vizitte DM bulgularına rastlanmayan ve gebelik öncesi DM olduğu bilinmeyen gebelerde gebeliğin 24-28. haftalarında oral glikoz testi yapılmakta ve DM ile ilişkili herhangi bir değerin eşik değerden yüksek çıkması durumunda kişi GDM olarak kabul edilmektedir. GDM düşük risk grubunu 25 yaşından küçük gebeler, yakın akrabalarda DM öyküsü olmayanlar, GDM prevalansı düşük etnik gruplar ve gebelik öncesi normal kiloda olanlar oluştururken, yüksek risk grubunu obez gebeler, DM Tip 2 öyküsü, glikoz intoleransı ve glikozürisi olanlar oluşturmaktadır (Metzger 1991).

2.1.2.4. Pre-diabetik

Açlık glikoz seviyesinin düşük olması veya oral glikoz testi sonuçlarının normalin üzerinde olmasıyla karakterize edilmektedir. Oral glikoz testinde 2. saatteki kan glikoz değerinin 140-199mg/dl ve açlık glikoz değerinin 100-125 mg/dl olduğu hastalar bu klinik gruba dahil edilmektedir (Erdoğan 1997).

2.1.2.5. Diğer Spesifik Tipler

Diğer spesifik tipler; Pankreas beta hücrelerinde genetik defekt, insülinin etkisindeki genetik defekt, ekzokrin pankreas hastalıkları (pankreotektomi, Pankreatit, Hemokromatozis) ve endokrinopatiler (Akromegali, Hipertroidi, Feokromasitoma vs.) gibi bozukluklar sonucunda görülmektedir (Olgun 2002).

2.1.3. Diabetes Mellitus Komplikasyonları

DM de akut ve kronik komplikasyonlar görülmektedir.

Akut komplikasyonlar: Mental ve fiziksel bozukluklara sebep olan, hayatı tehdit eden akut olarak gelişen komplikasyonlardır. Diabetin en önemli akut komplikasyonları; kan glikoz düzeyinin normalden fazla olması (hiperglisemi) ve buna bağlı olarak gelişen hiperglisemik ketoasidoz koması, hiperosmolar hiperglisemik nonketotik koma ve hipoglisemi koması gibi komplikasyonlardır. Akut hipoglisemide terleme, titreme, çarpıntı ve açlık gibi otonomik sendromlar ayrıca konsantrasyon bozukluğu gibi nöroglükopenik semptomlarda görülmektedir (Scobie 1998, Olgun 2002).

Kronik Komplikasyonlar: Birçok organ ve sistemde diabetten kaynaklanan kronik komplikasyonlar (nöropati, nefropati ve infertilite gibi) meydana gelmektedir. Hastalığın ilerlediği dönemlerde ortaya çıkıp yaşam kalitesini düşüren bozukluklardır (Popkin 1988).

2.2. Deneysel Diabet Modelleri

Deneysel diabet oluşturmak için cerrahi, genetik ve farmakolojik olmak üzere farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu deneylerde genellikle kemirgen hayvanlar tercih edilmektedir (Bliss 2000).

Deneysel diabet oluştururken en çok kullanılan kimyasallar streptozotosin ve alloksandır. Pankreas beta hücrelerini kümeler halinde tahrip eden bu ajanlardan daha spesifik olması nedeniyle genellikle STZ tercih edilmektedir. Diabet oluşturulmak istenen hayvana göre ajanın dozu ve enjekte edilme yöntemi (intraperitoneal, intravenöz veya subkutan) değişmektedir (Lenzen ve ark. 1996, Mythili ve ark. 2004). STZ veya alloksan pankreas beta hücrelerine karşı spesifik toksinler oluşturur ve beta hücrelerinin deformasyonuna yol açarak diabetin gelişmesine neden olur. STZ bu hücrelerdeki hasarı nedeniyle hipoinsülinemi, hiperglisemi ve doku hasarının yanısıra Tip 1 ve Tip 2 DM'nin deneysel olarak gelişmesine de neden olmaktadır (Dinçer 2004 ve Kanter ve ark. 2006).

2.2.1. Streptozotosin (STZ)

STZ; 1960 yılında *streptomyces achromogenes* kültüründen elde edilmiştir (Cabadak 2008). STZ'nin moleküler ağırlığı 265,2 g/mol kapalı kimyasal formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ şeklindedir. STZ açık sarı renkli suda ve alkolde hızlı çözünebilen ışığa ve neme duyarlı bir maddedir (Coşkun ve ark. 2005).

STZ yıllarca antibiyotik olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu antitümoral etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Günümüzde diyabetojenik etkisinden dolayı deneysel diabette kullanılmaktadır (Schein 1967). STZ pankreas beta hücrelerinde yapısal bozukluklara neden olup insüline bağlı ve insülininden bağımsız diabetin gelişmesine neden olur (Szkudelski ve ark. 2001).

STZ'nin 40-60 mg/kg aralığında intravenöz ya da intraperitoneal olarak ratlara enjekte edilmesi deneysel diabetin gelişmesini sağlamaktadır (Kök 2011). STZ uygulandıktan sonra kan glikoz değerinde 3 faz gerçekleşir. İlk faz STZ

uygulandıktan hemen sonra başlayıp hiperglisemik dönem olarak adlandırılmaktadır. Bu dönemde kan şekeri düzeyi oldukça yüksek plazma insülin düzeyi ise düşüktür. Uygulamadan sonraki ilk 2 saat içerisinde karaciğerdeki glikojenin ani yıkımından dolayı geçici hiperglisemi görülür. Kan şekerinin ani yükselişini engellemek, STZ uygulamasından önce hayvanın 12-18 saat aç bırakılmasıyla mümkündür. İkinci faz; 6 saat sonra başlar ve hipoglisemi ile karakterize edilir. Uygulanan diabetojenikten dolayı pankreas beta hücrelerinin kümeler halinde ölmesi ve aşırı miktarda insülin salınması sonucu hipoglisemi görülür. Bu dönemde plazma insülin düzeyi çok yüksektir. Üçüncü faz; 10- 12 saat sonra başlayan hiperglisemi dönemidir. Plazma insülin düzeyi düşer ve ilerleyen zamanlarda da düşük olarak kalır (Rajasekaran ve ark.2005).

2.3. Testis

2.3.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi

X veya Y kromozomunu taşıyan spermin ovumu döllemesi sonucunda fertilizasyon gerçekleşir ve gelişen gonadlar XX veya XY olarak gelişir (Sadler 2007, Moore 2007).

İnsanda primordial germ hücreleri gelişimin dördüncü haftasında vitellüs kesesinin duvarında allantoisin başlangıç yerinde bulunan endodermal hücreler arasında belirmeye başlar. Amibik hareketlerle son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler. Altıncı haftada primordial germ hücrelerinin altında bulunan mezenşim dokusu içine girip primer seks kordonlarının yapısına katılırlar (Sadler 2007, Carlson 2009). Gebeliğin yedinci haftasına kadar gonadlar her iki cinsiyette aynıdır ve farklılaşmamış gonadlar olarak isimlendirilirler. Mezonefrozun medialinde beliren kalınlaşma altındaki epitelin ve mezenşim dokusunun proliferasyonu sonucu genital (gonodal) kabartı şekillenir. Testis belirleyici faktör (TDF) için SRY geni gerekmektedir. Bu gen ise Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunmaktadır. Buradan Y kromozomunun TDF'yi düzenlediği ve cinsiyet belirlemede etkili olduğu anlaşılmaktadır. TDF primer

seks kordonlarının seminifer túbüllere farklılaşmasını sağlar. Embriyo XX seks kromozomlar taşıyorsa farklılaşmamış gonad korteksi overe dönüşür, medullası geriler. Embriyoda XY seks kromozomu bulunuyorsa medulladan testis gelişir, korteks gerileyerek dejenere olur. Embriyo gelişiminin 12. haftasında tunika albuginea belirmeye başlar. tunika albugineanın belirmeye başlamasıyla seks kordonlarının yüzey epiteliyle yaptığı bağlantılar kaybolur ve seminifer kordonlar; seminifer túbüllere, túbüli rekti ve rete testise farklılaşır. Seminifer túbüller puberteye kadar kapalı olarak kalırlar. Testisin yüzey epiteli düzleşip mezoteli şekillendirir (Carlson 2009).

Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri tarafından androjenler salgılanmaya başlar bu hormonlar dış genital organların erkeğe uygun şekillenmesini sağlar. Leydig hücreleri fõtal dönemde 18. Haftaya kadar androjen salgılar daha sonra puberteye kadar herhangi bir hormon salgılamaz. Puberte döneminde Lüteinleştirici hormon (LH) uyarımıyla testosteron salgılamaya başlarlar (Sadler 2007).

2.3.2. Testisin Anatomisi

Testis funiculus spermaticus aracılığıyla skrotum içerisinde asılı halde bulunan oval şekilli erkek üreme hücrelerinin yapıldığı bir çift organdır. Erişkin bir erkeğin testisi yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında, 10-14 gr ağırlığındadır. Sol testis genelde sağ tarafa oranla 1cm aşağıda bulunur. Testislerin *margo anterior* ve *margo posterior* denilen iki kenarı *facies medialis* ve *facies lateralis* adı verilen iki yüzü, *extremitas superior* ve *extremitas inferior* adı verilen iki ucu bulunmaktadır. Testisin iki kenarı, ön yüzü ve arka tarafında lateral kenarlar visseral periton ile kaplıdır. Peritonla sarılı olmayan medial bölüm vardır. Bu kısımdan kan damarları sinirler ve kanallar organa geçmektedir (Arıncı ve Elhan 2001, Sancak ve Cumhuriyet 2008).

Testis; fibroblast ve kollejen bakımında yoğun, kompakt bağ dokusundan oluşan tunika albuginea ile sarılmıştır. Bu tabaka testisin arka kısmında kalınlaşır ve mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten fibroz septumlar çıkar ve tunika albugineayı 250 adet lobüle ayırır. Her bir lobülde kıvrımlı halde 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Bu tübüller rete testis kanalına açılmaktadır. Tunika albugineanın hemen altında tunika vaskuloza adı verilen damarsal bir tabaka bulunur. Hemen üstünde ise iki katmandan oluşan tunika vaginalis tabakası yer almaktadır. Anteriorda testise yakın olup epididimisi saran kısım visseral tabaka dışta kalan kısmı ise pariyetal tabaka olarak adlandırılmaktadır. Bu katmanların dışında ise *fascia spermatica interna* onun dışında *musculus cremaster*, *fascia spermatica externa*, tunika dartos ve en dışta deri bulunmaktadır (Kuran 1983).

Testis ana damarları aortanın ön yüzünden ve böbrek arterlerinin 2 cm altından çıkar. Testiküler arter testisin arka yüzünden tek veya dallanmalar yaparak tunika albugineadan organa geçer ve seminifer tübül aralarında interlobüler arteriollerini oluşturur (Snell 1986).

2.3.3. Testisin Histolojisi

Erkek üreme sistemi; testisler, genital kanallar, eklenik genital bezler ve penisten oluşur. Testisler; sıkı bağ dokudan şekillenen sert kalın bir kapsül olan tunika albuginea ile sarılmış ve skrotum içine yerleşmiş oval yapılı bir çift organdır. Puberte dönemiyle birlikte testislerde spermatozoonların üretimi ve testosteron hormonunun salgılanması başlar (Junqueira ve Carneiro 2009).

Testisler dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olmak üzere üç tabakadan oluşan kalın bir kapsül ile sarılıdır (Eşrefoğlu 2004). Tunika vaginalis; Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fötüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotuma yerleşirler. Skrotuma geçişi sırasında beraberinde götürdüğü abdominal periton tabakasından tunika vaginalis şekillenir. Bu tabaka dışta pariyetal içte ise visseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarından tunika albuginea tabakasını örter (Junqueira ve Carneiro 2009). Tunika albuginea; testisin en belirgin tabakasıdır.

Yoğun bağ dokudan şekillenir (Eşrefoğlu 2004). Bu tabaka testisin posterior yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testis adı verilen gevşek bir yapı oluşturur. Kan damarları, lenf damarları ve genital kanallar buradan testise girer. Mediastinumdan gelişen septumlar her bir testisi 250 loba ayırır bu lobların her birinde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Her bir piramidal lobun daralan tepesinde seminifer tübüller kısa ve dar bir kanal olan tübülü rekti ile birleşir ve mediastinumun bağ dokusu içerisinde bulunan düz tübül şeklinde olan rete testisi oluştururlar (Gartner ve Hiatt 1997). Her tübül sertoli hücreleri ile germ hücrelerini içerir. Sertoli hücreleri bölünme yeteneğinden yoksun tübülün bazaline oturan ancak stoplazmaları organın içine doğru uzantılar yapan hücrelerdir. Seminifer tübül hücre yapısının %15'i kadarını sertoli hücreleri oluşturur. Bu hücrelerin arasındaki sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini şekillendirirler (Kayalı 1989). Sertoli hücrelerinin başlıca görevleri; spermatozoonların korunması ve beslenmesi, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolünde Androjen-Bağlayıcı-Protein (ABP)'yi üretmesi, hipofiz FSH salınımını engelleyen inhibin hormonu salgılaması ve spermatozoonların boşaltıcı kanallar içinde taşınması için testiküler sıvı salgılamasıdır (Gartner 2000). Tunika vasküloza; en içte bulunan gevşek bağ dokudan oluşan tabakadır. Bu tabakada interstisyel bağ dokusu hücreleri olan Leydig hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler yuvarlak ve tek çekirdeğe sahip olup testiküler androjenleri salgılar. İnterstisyel bağ dokusu seminifer tübülleri sararak tabakaların bütünlüğünü sağlar (Ross ve Pawlina 2006).

Germ hücreleri 64 günde çoğalmasını ve gelişmesini tamamlamaktadır. Seminifer tübülün bazaline oturan hücreler spermatogonium olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler puberte döneminde mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar. İki yeni hücre oluşur. Oluşan bu hücreler spermatogonyum A ve spermatogonyum B olarak isimlendirilir. Spermatogonyum A'lar kök hücreler olarak kalır ve tekrar mitotik bölünmelerle spermatogonyum B'leri oluşturur. Spermatogonyum B'ler ise primer spermatositlere dönüşen öncül hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro 2009). Primer spermatosit hücreler mayoz bölünme geçirir ve sekonder spermatositleri şekillendirir sekonder spermatositlerden haploid kromozumlu spermatidler gelişir, olgunlaşan bu hücrelerden spermatozoonlar oluşur (Sadler 1996).

2.4. Diabetes Mellitus ve Testis

Diabetes Mellitus hem erkek hem de dişilerde üremeyele ilgili birçok bozuklukla ilişkilendirilmiştir. Diabetten kaynaklanan kan glikoz seviyesinin yüksek olması damar ve sinirlerin tahribatına yol açar ve ilgili organda komplikasyonların görünmesine neden olur. Bu komplikasyonlar dişilerde vagina kuruluğu, cinsel isteksizlik ve enfeksiyonlara, erkekte ise infertilite başta olmak üzere libido ve penil ereksiyon yetersizliği gibi bozukluklara yol açmaktadır (Sanguinetti ve ark. 1995, Agbaje ve ark. 2007). Erkeklerde kan glikoz seviyesinin yüksek olması birçok komplikasyona neden olur bu komplikasyonlar testis dokusunda azalan sperm sayısı ya da üretilen spermelerde bozukluklar dolayısıyla infertilite şeklinde kendini gösterir (Kort ve ark. 2006). Kan glikoz seviyesi ile sperm kalitesi arasında ters orantı vardır. Kan glikoz seviyesinin yükselmesi ejakulasyonda hasarlı ya da ölü sperm sayısını arttırmaktadır. Sağlıklı sperm sayısının azalması canlıda yine infertiliteye neden olmaktadır (Langtry ve Balfour 1998).

Diabet ratlarda; testis ağırlığında, sperm kalitesi ve testosteron düzeyinde azalmalara neden olur buna bağlı olarak spermatogenezisde bozulmalar ve testiküler germ hücrelerinde artış gösteren apoptozisten kaynaklanan fonksiyonel bozukluklar görölmektedir. Histolojik olarak ise testis tunika albugineasında bozukluklar, seminifer tübüllerde atrofi, tübüllerin duvarını döşeyen germ epitel hücrelerinde bozukluklar, sertoli ve Leydig hücrelerinde vakuolizasyon, interstisyel dokudaki Leydig hücrelerinin sayı veya fonksiyonunda azalma ve bazal membranda kalınlaşmalar gerçekteşmektedir (Altay ve ark 2003).

DM, testiste histolojik deformasyonları yanısıra hipofiz-testis ekseninde de değişikliklere sebep olmaktadır. STZ ile yapılan deneysel diabetin seminifer tübüllerdeki insülin dağılımını etkilediği ayrıca LH, testosteron ve FSH düzeyleri üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir. Rat diabet modellerinde gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) hipofiz cevabında azalma olduğu bu canlılara GnRH uygulandığında ise FSH ve LH cevaplarında dalgalanmalar olduğu görölmüştür (Baccetti ve ark 2002).

2.5. Oksitosin Hormonu

1906'da gebe kedilerde çalışan Sir Hanry Dale bir hormonun uterus kontraksiyonunu sağlayarak doğumu kolaylaştırdığını farkedip yunanca hızlı doğum anlamına gelen Oksitosin (OT) adını vermiştir. OT 9 amino asitten (glycine, gluamine, leucine, proline, cyteine, tyrosine, isoleucine, asparagine ve cyteine) oluşan ve arka hipofizden salgılanan peptid yapılı bir hormondur. İlk defa 1953 yılında Vincent Du Vigneaud tarafından sentez edilmiş ve 1955 te Vincent'e Nobel ödülü kazandırmıştır (Du Vigneaud 1956).

Oksitosinin; bellek, stres, ağrı duyusu, timüs, bağışıklık sistemi, kemik gelişimi, kalp-damar sistemi, annelik gibi bazı davranışlar, üreme ve pankreas-şeker metabolizması ile ilgili olduğu bilinmektedir. OT uygulamasından sonra yapılan bellek testlerinde bellekte düşüş olduğu görülmüş bu da doğum sırasında yaşanan ağrının unutulmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bossmar ve ark 1995). Ratlara intraserebroventriküler ve intrapriton olarak uygulanan OT'nin ağrı duyusunu azalttığı yapılan çalışmalarla belirtilmiştir (Arletti ve ark. 1993). OT'nin öğrenmede azalmaya sebep olduğu ayrıca stres bozukluğunu azalttığı da bilinmektedir (Pitman ve Lasko 1993). Bu bilgilerin yanısıra OT'nin bazı sistemler üzerinde de etkili olduğu düşünülmektedir. OT'nin iskelet sistemi üzerindeki etkileri osteoklast mekanizmasını inhibe etmesi dolayısıyla kemikte artışa neden olması ayrıca özellikle gebelik ve laktasyon dönemlerinde kemik restorasyonunda etkili olması şeklinde sıralanabilir (Cassoni ve ark. 1998). Kalp-damar sistemindeki etkisiyle ilgili yeterli araştırma yapılmamış ancak; çevresel dolaşımda bulunan OT'nin kalp-damar üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Favearetto ve ark. 1997). Ayrıca çevresel OT uygulamasının arteriyel basıncın düşmesine neden olduğu belirtilmiştir (Petty ve ark. 1985). Haanwinckell ve ark. (1995) i.v ve i.p yollarla yaptıkları OT uygulamalarının Atrial Natriüretik Peptit (ANP) salınımını uyardığını ve idrarda sodyum atılımının hızlandığını kaydetmişlerdir (Haanwinckell ve ark. 1995). Timüs ve immün sistemle ilgili yapılan araştırmalar timüsta bulunan OT içeriğinin yaşla doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir (Geenen ve ark. 1986). OT timüs epitel hücreleri ile T lenfositler arasındaki ilişkiyi düzenler (Martens ve ark. 1996). Elands

ve ark. (1998) timus dokusunda ve timositler üzerinde OT'nin bağlanması için özel bölgeler olduğunu bildirmiştir.

Bu bilgilerin yanı sıra yapılan çalışmalar OT'nin beslenme, çiftleşme, doğum, annelik duygusu gibi davranışlar üzerinde etkili olduğunu da açıklamaktadır. Ratlara mikroenjeksiyon yöntemiyle vagus sinirinin dorsal motor çekirdeğine yapılan OT enjeksiyonunun mide hareketini engellediği görülmüştür. OT enjeksiyonundan önce lokal olarak OT uygulamasının ise mide hareketindeki azalmayı engellediği görülmüştür (Rogers ve Herman 1987). OT'nin annelik davranışları üzerindeki etkisini anlamak amacıyla gebe olmayan ratların beynine infüzyon yöntemiyle uygulanan OT'nin annelik duygusunu geliştirdiği kaydedilmiştir (Herbert ve ark. 1994).

2.5.1. Oksitosinin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

Son zamanlara kadar OT dişi hormonu olarak bilinmekteydi. Testis ekstraktında OT bulunması OT'nin erkek üreme sistemi üzerinde de etkili olabileceğini göstermiştir (Nicholson ve ark. 1984). Yapılan son çalışmalarda OT'nin erkek bireylerde hem cinsel davranışlar hem de üreme organlarıyla ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Dişi ve erkeklerde beyinde orgazmın uyandırdığı his OT'den kaynaklanmaktadır (Anderson Hunt ve ark. 1995, Carmichael ve ark. 1994). Ayrıca hem erkek hem de dişide OT'nin cinsel uyarım ve orgazm anında arttığı bilinmektedir (Carter 1992).

Oksitosin erkek üreme sisteminde; penis, testis, epididimis ve prostat bezinde bulunmaktadır (İnsel 1992). OT peniste ereksiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır (Melis ve ark. 1986). Testiste ise önemli üç fonksiyonu vardır; Seminifer tübüleri kuşatan kas hücrelerini uyararak seminifer tübül kontraksiyonunu sağlamak, steroidogenezi düzenlemek ve spermatozoon sayısının artmasını sağlamak. Seminifer tübül kontraksiyonunu sağlayan OT, spermatozoon hareketinde de etkili olur. OT sekresyonunun spermatozoon gelişiminde artış gösterdiği bilinmektedir (Nicholson ve Jenkin 1995). Son çalışmalara göre OT'nin spermatozoon gelişimini sağladığı ve bu hücrelerin epididimise taşınmasında etkili olduğu da belirtilmiştir

(Howl ve ark 1995). OT'nin spermatozoon sayısı üzerinde etkisinin olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. Boğalarla yapılan çalışmada OT enjeksiyonundan sonraki ilk ejakülasyonda spermatozoon sayısının %34,2 arttığı kaydedilmiştir (Berndtson ve Igboeli 1988). Koçlarda yapılan OT uygulamasının ise spermatozoon sayısını % 45 arttırdığı belirtilmiştir (Knight 1974). Oksitosin lokalizasyonu ve ekspresyonu türlere göre farklılık göstermektedir. Fare testisinde OT mRNA ekspresyonları henüz bulunamamışken, sığırların testis dokusunda yüksek seviyede OT mRNA ekspresyonuna rastlanmıştır (Ang ve ark. 1991). Tammar Wallaby'nin prostatında OT mRNA ekspresyonunun gerçekleştiği ancak testisinde OT mRNA ekspresyonuna rastlanmadığı kaydedilmiştir (Parry ve Bathgate 1998). İnsanlarda ise OT mRNA ekspresyonunun testis, epididimis ve prostatta gerçekleştiği bilinmektedir (Frayne ve Nicholson 1998). Rat testisindeki OT seviyesinin çevresel dolaşımdaki OT seviyesinden daha yüksek olduğu PCR yöntemiyle kanıtlanmıştır (Foo ve ark. 1991).

2.5.2. Oksitosinin Pankreas ve Şeker Metabolizması Üzerine Etkisi

OT'nin şeker metabolizması üzerinde etkili olduğu farklı dozlarda fare, tavşan, koyun, köpek ve inek üzerinde uygulanarak ortaya konmuştur. OT uygulanan farelerin pankreasında OT bağlanma bölgelerinin (OTR) arttığı bilinmektedir (Sulu ve ark. 1999). Tavşanlara uygulanan OT'nin ikinci dakikadan itibaren insülin düzeyinde anlamlı bir artışa neden olduğu glikoz ve glukagon düzeylerinin ise etkilenmediği belirtilmiştir (Knudtson 1983). Koyunlarda intravenöz OT uygulamasının insülin ve glukagon salınımını arttırdığı ifade edilmiştir (Mineo ve ark. 1997, Wallin ve ark. 1989). Köpeklerdeki OT uygulamasında onbeşinci dakikada plazma glikoz, insülin ve glukagon düzeylerinde artışlar görülmüştür (Aitszuler ve Hamshire 1981). Bu bilgilerin yanısıra OT düzeyinin hiperglisemide arttığı da bilinmektedir (Gutkowska ve ark. 1997).

2.6. Oksitosin Reseptörü

İlk defa Kimura ve ark. (1992) insanda OTR cDNA'sını izole etmiştir. OT hormonunun hem erkek hem de dişilerde birçok fonksiyonu olduğu yıllardır bilinsede çalışma mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. OT hormonunun etki edeceği hücrelerin yüzeylerinde bulunan ve OT'nin hücre yüzeyine bağlanıp etki göstermesini sağlayan bu molekülün bulunuşu oksitosinin etki mekanizmasının anlaşılmasında oldukça önemli bir adım olmuştur.

OTR rodopsin tipi sınıf I, G-proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper familyasının VPR alt ailesine bağlı bir reseptördür. OTR kurbağa *Ridibunda'nın* glomerulusunda da tespit edilmiştir (Ammar ve ark. 1994).

OTR'ü; rahimde, meme bezinde (Solof ve ark. 1989), hipofiz bezinde (Antoni 1986), beyinde (Tribollet ve ark. 1988), böbrekte (Schmidt ve ark, 1990), timüsta (Elands ve ark 1988), yumurtalıkta ve testislerde bulunmaktadır. RT-PCR tekniği kullanılarak bu organlarda OTR gen ekspresyonuna bakılarak son yıllarda bu bilgiler yeniden teyit edilmiştir (Bathgate ve sernia 1994).

OTR geni insanlarda 3p25 kromozomunda yer alır. Bu genin üzerinde 3 intron ile 4 ekson bulunur. Oksitosinin yanısıra, arginin vasopresin (AVP) ve oksitosin agonistleri veya antagonistleri gibi diğer moleküller, benzer yapıları sebebiyle reseptörü bağlayabilirler. OT'nin hücre yüzeyinde bulunan transmembran OTR'ne bağlanması, daha sonra çeşitli hücre içi sinyal yollarını da harekete geçiren reseptörü aktive eder. Bu bağlanma başta uterus kasılmaları olmak üzere birçok biyolojik etkinin ortaya çıkmasını sağlar (Smith 2007).

2.6. 1. Oksitosin Reseptörü Yapısı

OTR'nin son klonlamaları; G-proteini eşlenik membran reseptörleri büyük ailesinin üyeleri olduğunu ortaya koymuştur. Bunların hidropati profillerindeki benzerliklerine göre, G-proteini eşlenik reseptörlerinin, membranı yedi kez

sarmalayan ve bu nedenle yedi adet helezoni transmembran etki alanı (TEA) içeren bir protein molekülünden oluştuğu bilinmektedir. Bu topoloji sebebiyle, bu reseptörlerde dört adet hücre dışı etki alanı (E1-E4) ve dört adet sitoplazmik etki alanı (C1-C4) bulunur. Bu etki alanları, TEA'nı bağlayan üç hücre-dışı ve üç hücre içi halkanın yanı sıra bir hücre dışı N-terminal ucu (E1) ve bir hücre içi C-terminal ucu (C4) içerir (Baldwin, 1993).

Şu anda insan, fare ve domuz OTR'lerinin cDNA sekansları klonlanmış ve sıralanmıştır (Kimura ve ark. 1992, Gorbulev ve ark. 1993, Rozen ve ark. 1995).

2.6. 2. Oksitosin Reseptörünün Gen Yapısı

İnsan V2R geni Xq28 kromozomunda bulunur. Kodlama bölgesi, iki intron tarafından kesintiye uğrar. İlk intron reseptörün N-ucu kısmını kodlayan bölgede yer alır ve kodon 9'u keser. Intron 2 TEA6'yı kodlayan bölgenin hemen ardından gelen kodlama sekansını keser. (Seibold ve ark. 1992) V1a ve OTR'leri kodlayan genlerin kodlama bölgesi, her biri sadece tam olarak V2R genindeki intron 2'nin bulunduğu pozisyona eşdeğer bir pozisyonda bulunan bir intron tarafından kesintiye uğrar. Ancak, bu intronların boyutları değişir: V2R'deki intron 2 sadece 105 baz çiftinden oluşurken, V1aR ve OTR'de buna karşılık gelen intronlar ise, sırasıyla, 2.2 ve 12 kilobazdır. Fare OTR geni bir intron, insan OTR geni iki ek intron ihtiva eder (Rozen ve ark. 1995).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan (KAÜ-HADYEK) 25.05.2015 tarihinde 2015-041 sayılı etik kurulu numarası ile onay alınmıştır. Çalışmanın deneysel aşamaları Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, laboratuvar çalışmaları ise Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı Materyalinin Temini ve Barındırılması

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Çalışmada 2 aylık 18 adet *Balb-c* cinsi erkek fare kullanıldı. Her kafeste 6 hayvan olmak üzere denekler rastgele ayrıldı. Hayvanlar 22 ± 2 sıcaklıkta ve % 40-60 civarında nem koşullarında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlıkta barındırıldı. Her bir kafes ve suluk her gün temizlendi. Hayvanlar pelet yemlerle ve çeşme suyu verilerek ad-libitum olarak beslendi. Beslenmede kullanılan standart fare yemi Erzurum Bayramoğlu Yem Fabrikasından temin edildi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise çelik bilyeli suluklarda verildi.

3.2. Metot

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Hayvanlar temin edildikten sonraki iki hafta hiç bir uygulamaya tabi tutulmadan adaptasyonları sağlandı. Adaptasyon sonrası denekler Tablo 1'de gösterildiği gibi gruplara ayrıldı.

Tablo 1. Deney grupları ve yapılan uygulamalar.

Deney Grupları	Denek Sayısı	Yapılan Deneysel Uygulama
Kontrol Grubu	(n=6)	Her hangi bir uygulama yapılmadı
Sham Grubu	(n=6)	Sodyum sitrat çözeltisi i.p olarak uygulandı. (pH:4.5)
Diabet Grubu	(n=6)	pH değeri 4.5 olan 0.1 M Sitrat tamponu içerisinde çözdürülmüş Streptozotosin (STZ) 100 mg/kg dozda i.p yolla, tek sefer uygulandı.

2.2.2 Diabet Oluşturulması

3.2.2.1. STZ Solüsyonunun Hazırlanması

STZ (Sigma S0130-1G); 40mg/1ml oranında Sodyum sitrat tamponu içerisinde çözdürüldü. STZ ışık ve sıcaktan olumsuz etkileneceğinden dolayı taze hazırlanıp alüminyum folyo ile sarılı tüpte ve buz dolu beherde bekletildi. STZ grubuna intra peritoneal olarak 1 ml'lik insülin enjektörü ile hayvan ağırlıkları belirlendikten sonra 100 mg/kg oranında tek doz şeklinde uygulandı (Bingöl ve Kocamış, 2009).

3.2.2.2. Sodyum Sitrat Çözeltisinin Hazırlanışı

0.294 gr sodyum sitrat dihidrat ($C_6 H_5 Na_3 O_7 \cdot 2H_2O = 294,1 \text{ g/mol}$) alınarak deiyonize su ile hacim 100 ml ye tamamlandı ve 1 Normal HCl ile Ph'sı 4.5'e ayarlandı.

3.2.3. Ağırlık Ölçümlerinin Yapılması

Deneklerin ağırlıkları STZ uygulamasından hemen önce (0.gün) ve dokuların alındığı gün (30.gün) hassas dijital terazi (Precisa-XB220A) ile tartılarak, kaydedildi.

3.2.4. Kan Şekeri Seviyesinin Belirlenmesi

Bütün hayvanların kan glikoz seviyeleri 12 saat aç bırakıldıktan sonra ve STZ uygulamasına geçilmeden önce kuyruk venlerinden alınan birer damla kanla glikometri cihazı (Rocho Accucheck Go) kullanılarak ölçüldü. 72 saat sonra diabet grubu hayvanları tekrar 12 saat aç bırakılarak açlık kan glikoz düzeyleri yine aynı yöntemle ölçüldü. Açlık kan glikoz düzeyi 200 mg/dl üzerinde olan hayvanların diabet olduğu kabul edildi (Kanitkar ve Bhonde 2004). Son olarak dokular alınmadan önce hayvanların tekrar 12 saat açlık sonrası kan glikoz seviyeleri ölçüldü.

3.2.5. Doku Örneklerinin Alınması

Dokular STZ uygulamasından 30 gün sonra alındı. Dokular alınmadan önce hayvanlar 12 saat boyunca aç bırakılıp son ağırlık ölçümleri ve açlık glikoz seviyeleri belirlendi. Eter anestezisi altında servikal dislokasyon uygulanarak, ötenazi edilen deneklerin testis dokuları alındı.

Alınan dokuların ağırlıkları hassas terazide belirlendi. Sağ testis dokusu immunohistokimyal ve histolojik çalışmalarda kullanılmak üzere rutin histolojik işlemlerden geçirildi. Sol testis dokusu ise RT-PCR analizleri için homojenizatörde (Wiggen Hauser) homojenize edildikten sonra TRI Reagent solüsyonuna alındı.

3.2.6. Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması

Alınan sağ testis dokuları histolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmek üzere % 10'luk formol ve buoin solisyonlarında tespit edildi. Ardından dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Hazırlanan bloklardan krom-alum-jelatin ile kaplanan lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Testis dokusunun genel olarak histolojik yapısını incelemek amacıyla Crossman'ın üçlü boyaması (triple boyama), Hemotoksilen-Eosin (H&E) ve Periyodik Asit Shiff (PAS) boyama teknikleri uygulandı. Kapatılan prepratlar değerlendirilmek üzere ışık mikroskobunda (Olympus Bx51, Japan) incelenip gerekli kısımlar fotoğraflandı. Preparatlarda, tubulus seminiferus kontortus çapları da değerlendirildi her bir testis dokusu için yüz adet seminifer tubülün çapı oküler milimetre ile ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.7. İmmunohistokimyasal İnceleme

Bloklanan dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlerin bir kısmı rutin histolojik incelemeler için geriye kalanı ise OTR'nin testis dokusunda immunohistokimyasal lokalizasyonunu incelemek amacıyla kullanıldı. Testis dokusunda OTR immunoreaktivitesini incelemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC) uygulandı. Alınan kesitlere deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemleri uygulandı ardından fosfat buffer salin (PBS) (0,1 M, pH; 7,2)'de çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 0,1 M'lik PBS'te hazırlanmış % 3'lük H₂O₂'de 20 dk inkube edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra antijenleri açığa çıkarmak amacıyla 10 dk mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonun içinde 600 watt ısı uygulandı. Kesitler Tekrar 3-5 dk boyunca PBS ile yıkayıp ardından spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla sekonder antikora uygun UV serumda (%10) 10 dk inkube edildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitler üzerine anti-OTR antikoruna (abcam:ab217212 (1:250 dilüsyon oranında)) uygulandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Primer antikorun inkübasyonundan sonra tekrar PBS ile yıkanan dokulara primer antikorun üretildiği

türe karşı olan biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı ve 30 dk oda sıcaklığında bırakıldı. Örnekler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra streptavidin peroksidaz ile oda ısısında 30 dk. inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kromojen uygulaması için Diaminobenzidine (DAB (Thermo TA-125-HD)) tekniği uygulandı (Shu ve ark 1988).

Kesitlere kromojen solüsyonu uygulandıktan sonra ışık mikroskopunda kontrol edilerek immunoreaktivitenin oluşumuna göre reaksiyon distile su ile durduruldu. Hazırlanan dokulara son olarak zıt boya olarak hemotoksilen uygulandı ve dehidrasyon–saydamlaştırma işlemleri sonucunda kesitler entellan yardımıyla lamelle kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskop altında incelenerek fotoğraflandı. Kesitlerde, boyanan hücrelerin boyanma dereceleri belirlendi. Boyanma derecesi: 0 (reaksiyon yok), +1 (az yoğun), +2 (orta derecede yoğun), +3 (çok yoğun) olarak değerlendirildi.

Dokulardaki OTR immunoreaktivitesinin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacıyla negatif kontrole primer antikor aşaması atlatılarak diğer işlemler aynı şekilde uygulandı.

3.2.8. RT-PCR ile Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu için alınan sol testis doku örnekleri 1ml Tri-Reagent (SIGMA, 93289) solüsyonu içerisinde homojenizatör yardımıyla homejenize edildi (Bingöl ve Kocamış 2010). Homejenize edilen örnekler +4 °C de muhafaza edildi.

3.2.8.1. RNA İzolasyonu

Tri-Reagent içerisine alınan örneklere 0.2 ml kloroform eklenip 15 sn çalkalandı ve oda ısısında 10 dk beklendi. Hazırlanan karışım +4°C de 13000 rpm de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte RNA, ortada DNA ve en altta protein

olmak üzere ependorf tüplerde 3 bölge fark edildi. En üstte bulunan RNA kısmı diğer bölgelere temas edilmeden steril ependorf tüplere aktarıldı.

DNA ve RNA içeren örneklerimiz süpernatant ve pelet olarak iki kısma ayrıldı. Dip kısma çöken pelete temas etmeden üstte bulunan süpernatant kısmı mikropipetle çekilerek 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. RNA moleküllerini dibe çöktürmek amacıyla tüplere 0.5 ml izoproponal ilave edildi ve oda ısısında 10 dk bekletilip +4°C de 13000 rpm de 8 dk santrifüj edildi. RNA moleküllerinin tüpün dip kısmında jelimsi ya da beyaz bir pelet halinde çöktüğü gözlemlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve RNA peletine 1 ml % 75 lik etanol ilave edilip vortekslendi ve -20 °C de bir gece RNA molekülleri yıkanmaya bırakıldı.

Yıkanan RNA molekülleri tekrar +4°C de 5 dk boyunca 8000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant kısımda bulunan sıvı tüpten atıldı böylece RNA'dan etanol uzaklaştırıldı ve pelet kısımda bulunan saf RNA molekülleri elde edildi. Pelet kısımdaki RNA'dan etanolü uzaklaştırmak amacıyla örnekler çeker ocakta 15-20 dk kurutuldu. Son olarak izole edilen RNA örneklerine 80 µl ddH₂O eklenerek -20 ye alındı.

Spektrofotometre ile 260 nm dalga boyunda 1µl deki RNA miktarı ölçüldü ve 3 µg RNA içeren solüsyon hesaplandı.

3.2.8.2. RNA'ların Spektrofotometrede Ölçümü

Fare testis dokusundan İzole edilen total RNA'ların saflığı nanodrop ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ayrıca DNA veya protein kirliliği görülmediği dolayısıyla her hangi bir saflaştırma işlemine gerek kalmadığı anlaşıldı.

Elde edilen RNA moleküllerinde kontaminasyona dikkat edilerek en uygun MgCl₂ ve enzim oranlarında optimize edildi ardından en uygun RT-PCR programları kullanılarak cDNA molekülleri elde edildi. Elde edilen cDNA örnekleri OTR genine uygun primerlerle en uygun sıcaklık ve PCR döngülerinde çoğaltıldı. DNA'ların çoğaltılmasında β-aktin ve OTR olmak üzere iki primer seti kullanıldı. Çoğaltılan

DNA örnekleri agaroz jelde yürütüldü ve bulgular değerlendirilmek üzere kaydedildi.

3.2.8.3. Komplementer DNA (cDNA)'nın Üretimi

mRNA çekirdekten çıkmadan önce uç kısımlarında Poly A kuyruğu oluşur. Adenin bazı bakımından zengin olan bu kuyruk Oligo dT primerleri ile bağ kurabildiğinden Oligo dT primerler kullanıldı. Her bir örnek için 3 µg RNA içeren solüsyona 1 µl Oligo dT primerleri eklenip nükleaz (NF) içermeyen su ile hacim 12 µl'ye tamamlandı.

RT reaksiyonu için Fermentas Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (K1622) kullanıldı. Tüm basamaklar kit prosedürüne göre yapılmıştır. Bir önceki basamakta elde edilen mRNA örneklerine 4 µl 5X Reaction Buffer Tamponu, 1 µl RNase inhibitör, 2 µl hazır olarak temin edilen 10 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) ve 1 µl revert Aid M-MuLV revers transkriptaz enzimi eklenmiştir. Oluşan 20 µl karışım 42°C'de 60 dk ve 70°C ve 5 dk tutuldu. Program sonunda elde edilen cDNA molekülleri -20 °C'ye alındı.

3.2.8.4. DNA'nın Çoğaltılması

cDNA içeren tüplerin her birinden 1 µl örnek DNA, 2,5µl 10X tampon, 2,5 µl MgCl₂, 2 µl dNTP, 2,5 µl OTR-primer-F, 2,5 µl OTR-primer R, kontrol grubu için 2,5 µl Aktin F, 2,5 µl Aktin R, 0,5 µl Taq DNA Polimeraz son olarak toplam hacmi 25 µl tamamlamak için 11,5 µl ddH₂O eklenerek tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 2'de gösterilen PCR programları uygulandı. Elde edilen ürünler -20 °C'ye alındı.

Tablo 2. DNA örneklerine uygulanan PCR programı.

94°C'de, 2dk	} X 40
94°C'de 1 dk,	
60°C'de, 1dk,	
72 °C'de 1 dk	
72°C'de 5dk	
4°C'de 5 dk	

Tablo 3. DNA' nın çoğaltılmasında kullanılan primerler

Oxtr, reverse	5'AGGACGAAGGTGGAGGAGTT'3
Oxtr, forward	5'TTCTTCGTGCAGATGTGGAG'3 (Kasahara ve ark. 2013)
β-aktin reverse	5'CCTAGAAGCATTTCGCGGTGCACGATG'3
β-aktin forward	5'TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT'3 (Bingöl ve Kocamış 2009)

3.2.8.5. Örneklerin Jelde Yürütülmesi

Elde edilen DNA molekülerini incelemek üzere %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. Erlen mayere alınan 2,512 gr agar üzerine 250 ml TBE (Tris-Borate-EDTA) ilave edilerek iyice çözdürüldü. Eritilen agara 12,5µl ethidium bromide eklenerek jel tankına döküldü. Jel tankı oda ısısında 45 dk tutularak kalıplaşması beklendi. Oluşan kalıplar içi TBE dolu olan elektroforez tankına yerleştirildikten sonra taraklar çıkartıldı.

Son olarak elde edilen PCR ürünlerinden yeni tüplere 10 µl alınıp üzerine 2,5 µl yükleme boyası (loading dye, G7654) eklendi. Tarağın ilk ve son kuyucuğuna hazırlanan leader 10 µl, diğer kuyucuklarda sırasıyla 10µl hazırlanan DNA

örnekleri konularak yükleme işlemi tamamlandı. Elektroforeze alınan örnekler 50 dk süreyle 90 V'ta yürütüldü. Sonuçlar UV ışık altında fotoğraflandırılıp değerlendirmek üzere kaydedildi.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

İstatistik analiz için SPSS programının 16.0 versiyonu kullanıldı (SPSS 2007). Gruplar arası çoklu karşılaştırmalar için one-way ANOVA kullanıldı. Homojen gruplar için Benferroni, homojen olmayan gruplar için Tamhene testleri uygulandı. İkili karşılaştırmalar için ise yine SPSS 16.0 da paired-samples t testi uygulandı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda deneklerin canlı ağırlıkları, testis ağırlıkları, kan-glikoz değerleri seminifer tubul çapları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Testis dokusunda OTR ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle de incelenip elde edilen bulgular değerlendirilmiştir.

4.1. Canlı Ağırlığı

Canlı ağırlık değerlendirmeleri 0. ve 30. günlerde yapılmıştır. Bütün gruplardaki hayvanların ağırlıkları aynı günlerde belirlenip her grup kendi içinde karşılaştırılmıştır. Kontrol ve sham grupları ortalama canlı ağırlıkları kendi içerisinde değerlendirildi ve istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Diabet grubu kendi içerisinde ortalama canlı ağırlık yönünden incelendiğinde günlere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($P < 0,05$). Diabet grubunda 0. günde ve 30. günde yapılan canlı ağırlık ölçümleri karşılaştırıldığında 30. günde belirgin bir düşüş olduğu görüldü (Tablo 4).

Tablo 4. Grupların grup içinde 0. ve 30.gün canlı ağırlık karşılaştırması.

Gruplar	N	Canlı ağırlık (gr) \pm SD	t
Diabet 0.gün	6	37.00 \pm 4.5	4.781*
Diabet 30.gün	6	31.66 \pm 2.8	
Sham 0.gün	6	33.33 \pm 4.2	0.88
Sham 30.gün	6	35.83 \pm 3.3	
Kontrol 0.gün	6	38.66 \pm 2.4	0.89
Kontrol 30.gün	6	40.00 \pm 3.5	

* $P < 0.05$ (SD:Standart sapma, t: t değeri)

4.2. Testis Ağırlığı

Tüm gruplara ait testis doku ağırlıkları sağ ve sol olarak gruplar arasında ayrı ayrı değerlendirildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede sağ ve sol testis ağırlıkları açısından istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 5 ve 6).

Tablo 5. Gruplar arasında 30. günde sağ testis ağırlığı karşılaştırması.

Gruplar	N	Sağ testis ağırlığı (gr) \pm SD	F
Diabet	6	0.113 \pm 0.022	0.516
Sham	6	0.121 \pm 0.026	
Kontrol	6	0.123 \pm 0.013	

$P < 0.05$ (SD: Standart sapma, F: F değeri)

Tablo 6. Gruplar arasında 30.günde sol testis ağırlığı karşılaştırması.

Gruplar	N	Sol testis ağırlığı (gr) \pm SD	F
Diabet	6	0.121 \pm 0.012	0.144
Sham	6	0.127 \pm 0.011	
Kontrol	6	0.128 \pm 0.010	

$P < 0.05$ (SD: Standart sapma, F: F değeri)

4.3. Tubulus Seminiferus Kontortus Çapı

Her bir hayvandan alınan testis dokusu kesitleri incelendi. Her denekte 20 adet olmak üzere her bir gruptan 120 adet tubul ölçüldü. Ölçümü yapılan tubulus seminiferus kontortus çapları üç grup arasında karşılaştırıldı (Tablo 7). Kontrol ve sham gruplarında seminifer tubul çaplarının birbirine benzer uzunlukta olduğu görüldü. Ancak diabet grubuna ait tubul çaplarının diğer gruplara göre istatistiksel ($P < 0,05$) olarak daha kısa olduğu görüldü.

Tablo 7. Gruplar arasında seminifer tubul çaplarının karşılaştırılması.

Gruplar	N	Tubul sayısı	Seminifer tubul çapı (μm) \pm SD	F
Diabet	6	120	182.28 \pm 6.7 ^a	417.02*
Sham	6	120	215.76 \pm 11.3 ^b	
Kontrol	6	120	213.90 \pm 11.4 ^b	

Farklı üst karakterler arasında anlamlı istatistiksel fark vardır. *P<0.05 (SD:Standart sapma, F: F değeri)

4.4. Kan- Glikoz Değeri

Tüm grupların kan-glikoz değeri 0. ve 30. günlerde ölçülüp elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırılığında 0. gündeki üç grup ile 30. gündeki sham ve kontrol gruplarının kan glikoz seviyelerinin benzer olduğu ve 30. gün diabet grubu kan glikoz seviyelerinin diğer gruplardan belirgin bir şekilde yüksek olduğu ve bu farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü (Tablo 8).

Tablo 8. Gruplar arası kan glikoz değerlerinin karşılaştırılması.

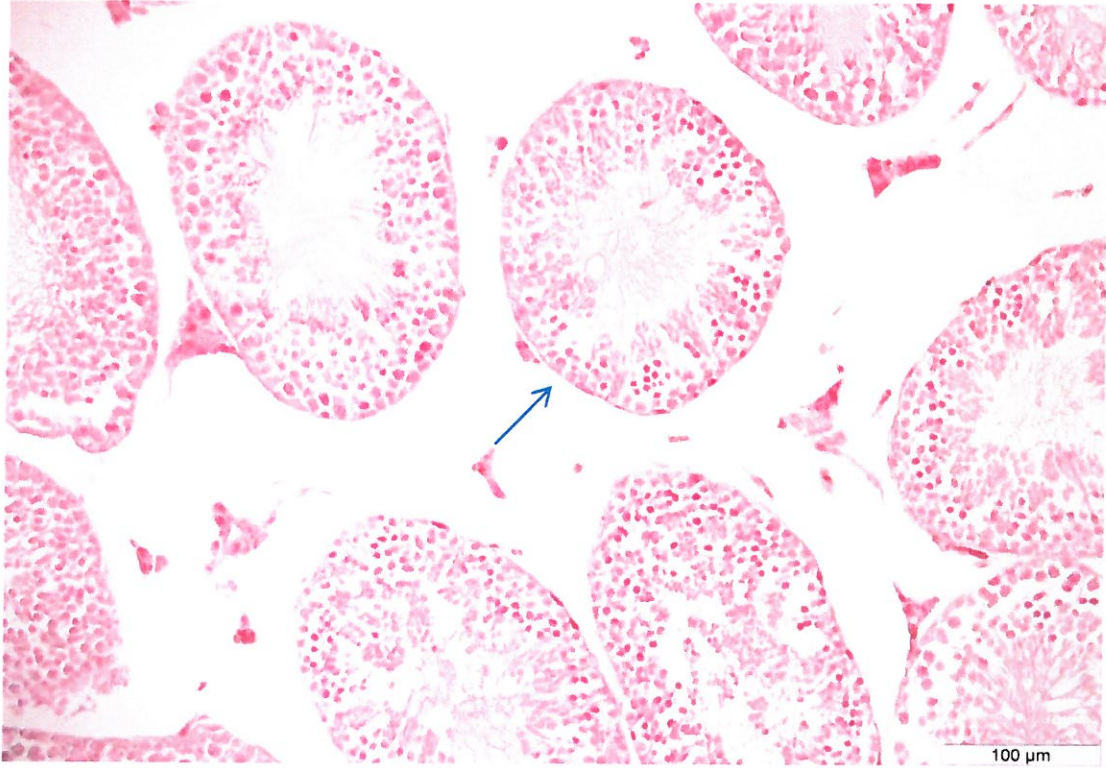
Gruplar	N	Glikoz mg/dl \pm SD	F
Diabet 0.gün	6	79.16 \pm 6.7 ^a	99.305*
Sham 0.gün	6	77.83 \pm 7.6 ^a	
Kontrol 0.gün	6	79.16 \pm 4.1 ^a	
Diabet 30.gün	6	309.00 \pm 53.5 ^b	
Sham 30.gün	6	82.83 \pm 7.4 ^a	
Kontrol 30.gün	6	86.50 \pm 10.1 ^a	

Farklı üst karakterler arasında anlamlı istatistiksel fark vardır. *P<0.05 (SD:Standart sapma, F: F değeri)

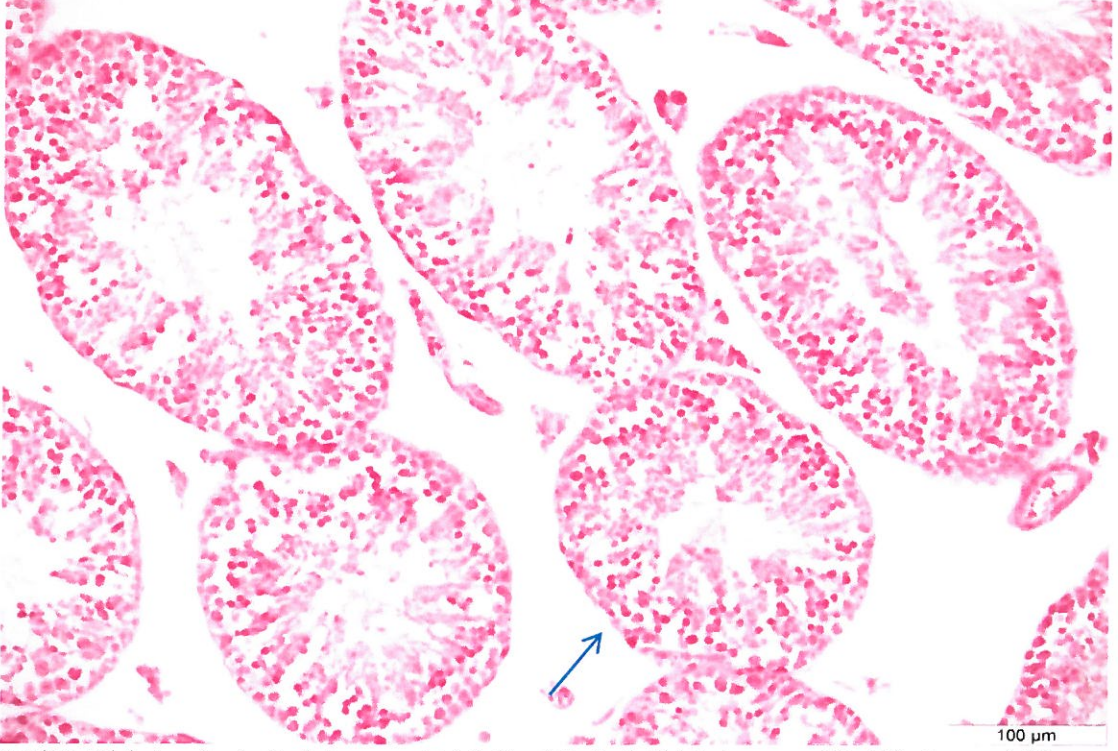
4.4. Histolojik Değerlendirme

Hazırlanan preparatlar mikroskopik olarak incelenmiştir. Testis dokusunun genel histolojik yapısını incelemek amacıyla yapılan triple ve Hematoksilen & Eosin boyamada kontrol ve sham grubu kesitlerinde tubulus seminiferus kontortusların ve içerisinde bulunan spermatogenetik hücrelerin, intersitisyel alanların ve bu alanlarda bulunan testiküler hücrelerin normal yapıda olduğu görüldü (Şekil 1,3 ve 4).

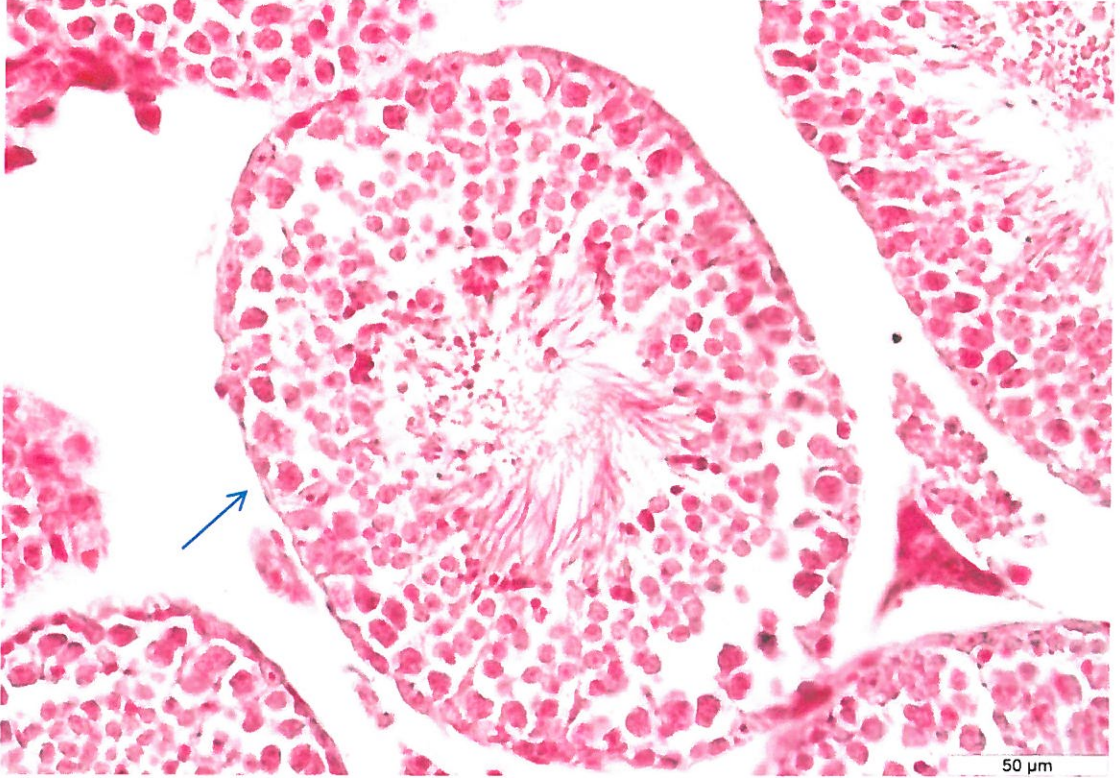
Diabet grubunda yapılan incelemeler sonucunda testis dokusunda bulunan tubulus seminiferus kontortusların yapısının kontrol grubuna göre daha düzensiz olduğu görüldü. Burada bulunan spermatogenetik hücre serilerinin, intersitisyel alanlarda bulunan yapılar ve Leydig hücrelerinin diğer gruplara göre herhangi bir histolojik farklılık göstermediği belirlendi (Şekil 2 ve 5).



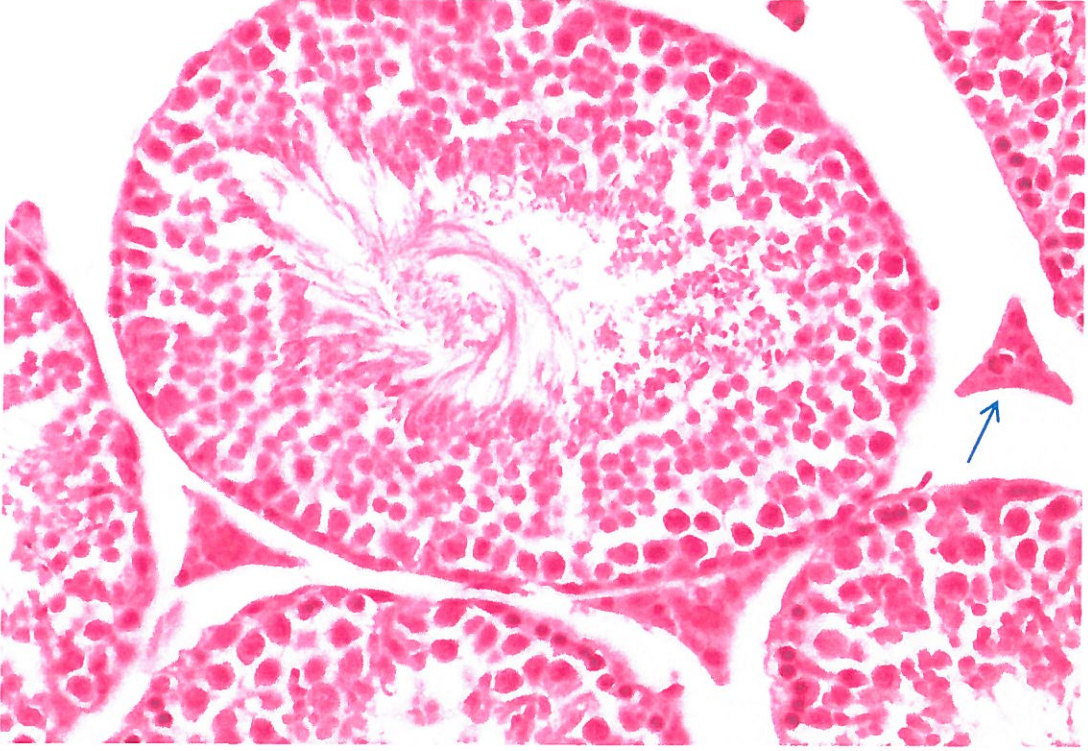
Şekil 1. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Bar: 100 µm.



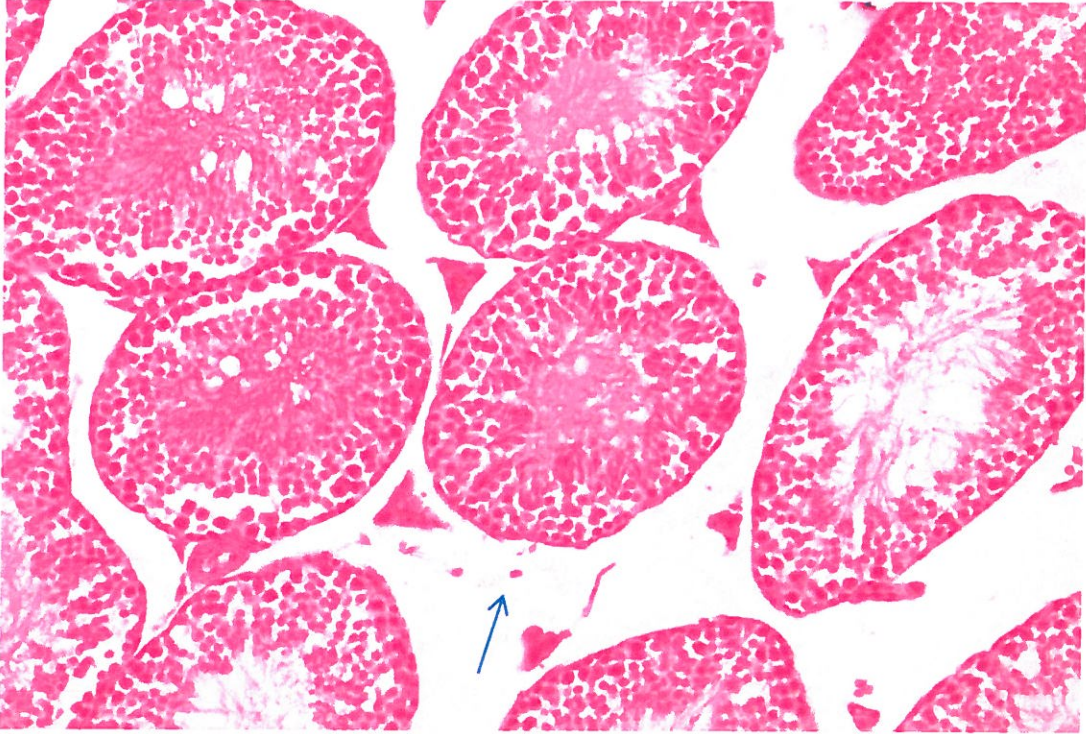
Şekil 2. Diabet grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Bar: 100 µm.



Şekil 3. Sham grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Bar: 50 µm

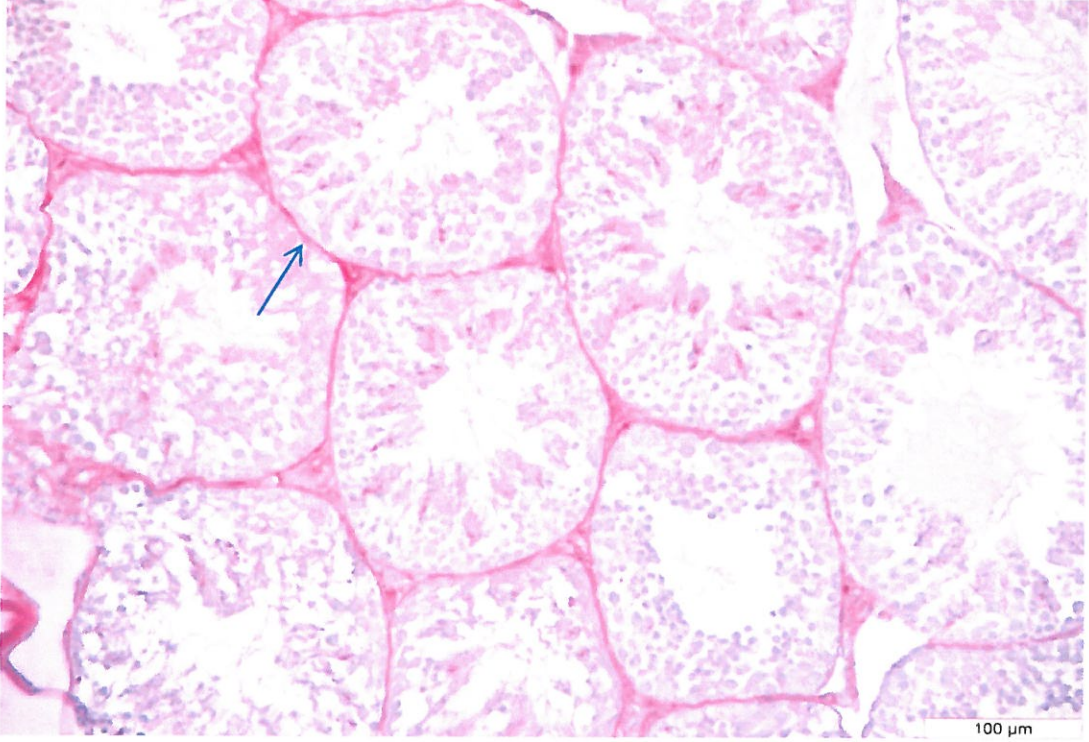


Şekil 4. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H&E Ok: İntersitisel alan. Bar: 50 μ m

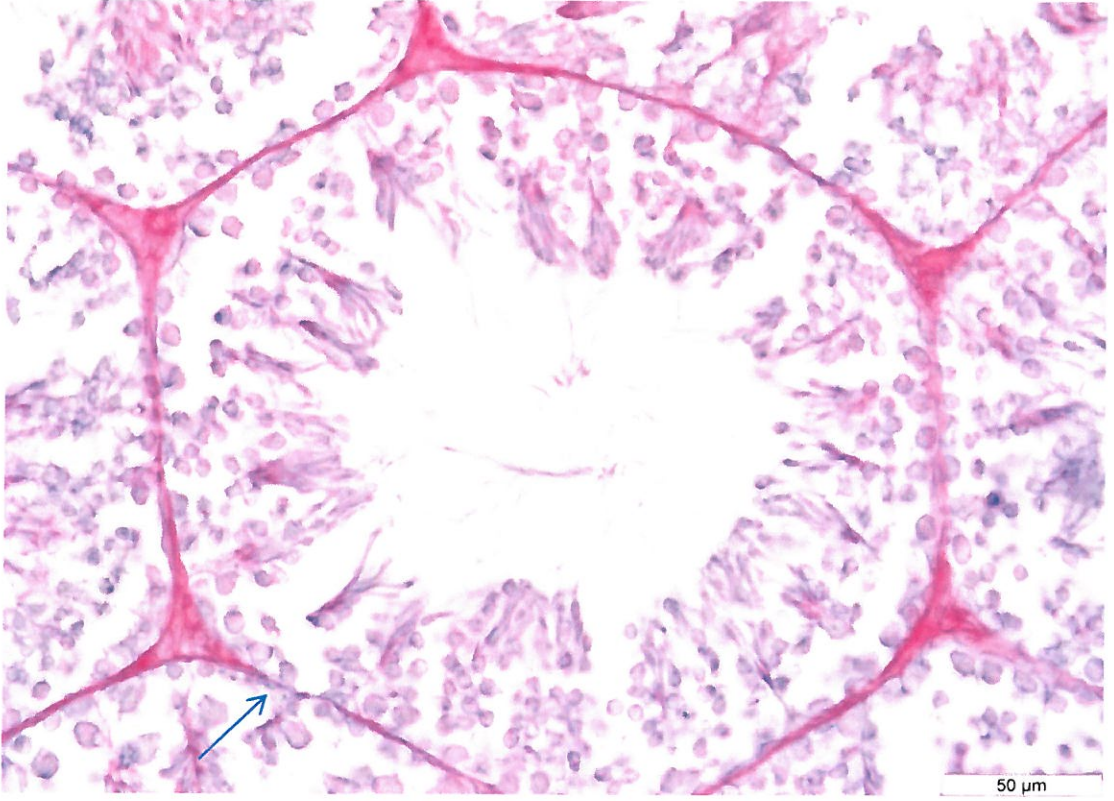


Şekil 5. Diabet grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H&E Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Bar: 100 μ m.

PAS boyaması yapılan kesitlerde tüm gruplarda tubulus semineferus kontortusları çevreleyen bazal membran yapısının benzer olduğu tespit edildi (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. PAS boyama. Ok: Tubulus semineferus kontortus bazal membranı. Bar: 50 µm.

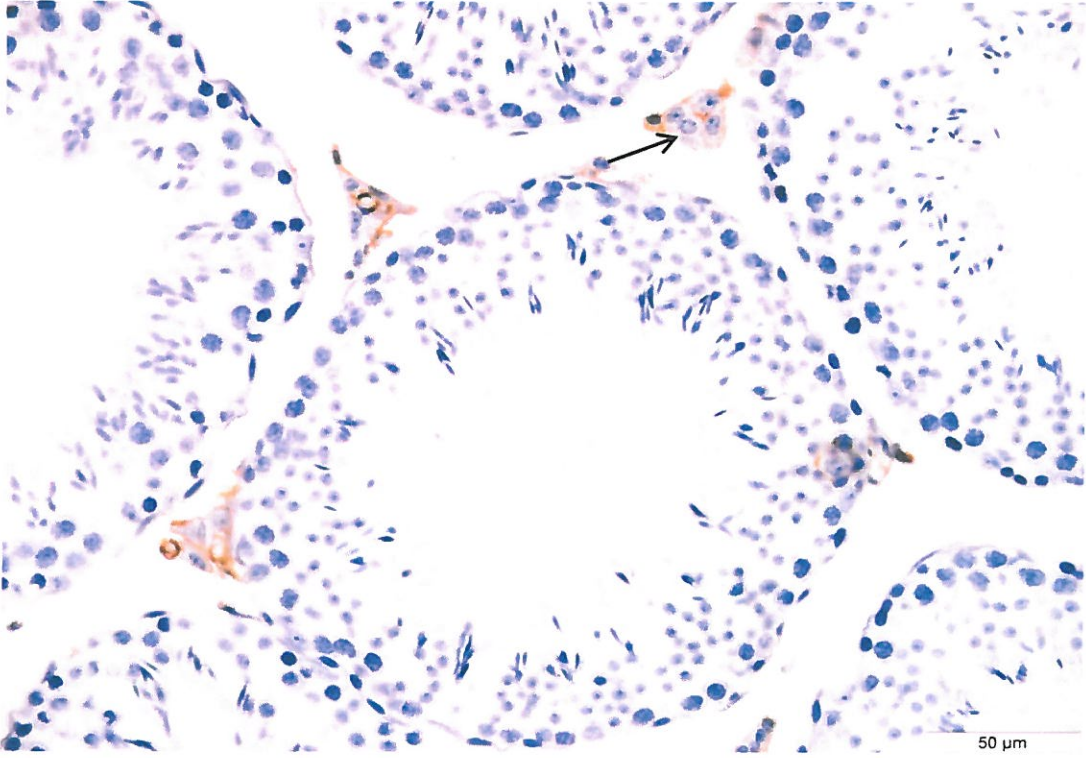


Şekil 7. Diabet grubu testis dokusunun histolojik görünümü. PAS boyama. Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar.Bar: 50 µm.

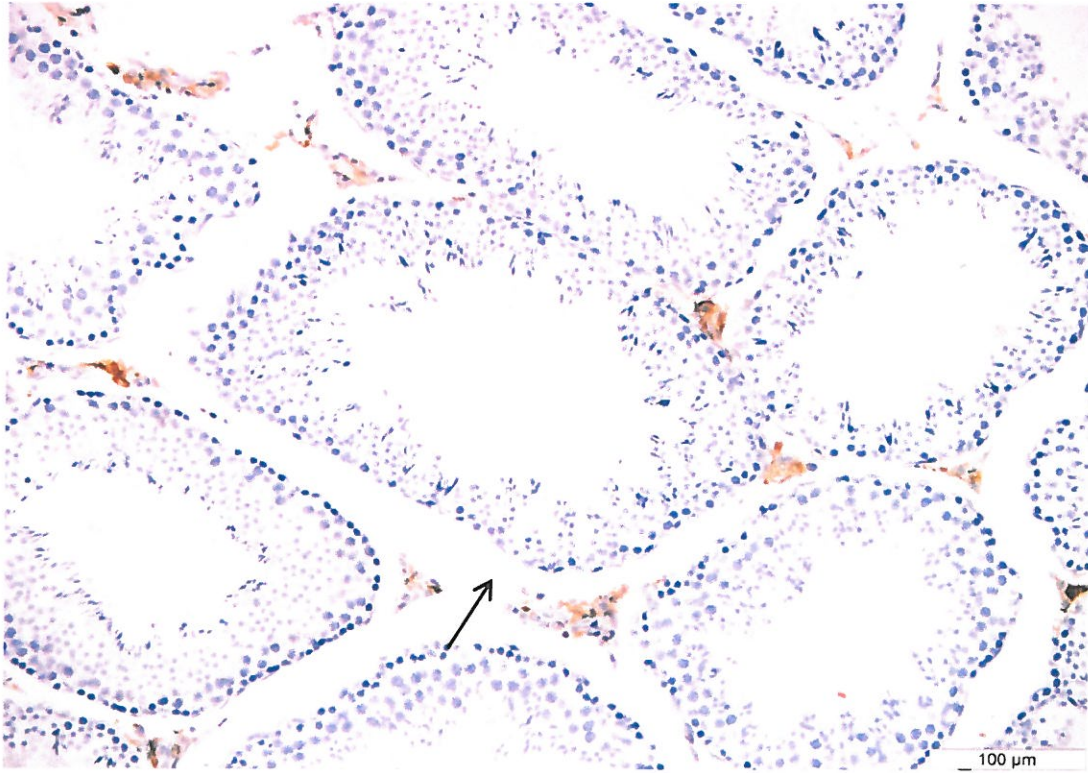
4.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

OTR immunoreaktivitesini belirlemek amacıyla deneme, kontrol ve sham gruplarına ait testis kesitleri imminohistokimyasal olarak incelendi. Işık mikroskopuyla yapılan incelemeler sonucu OTR immunoreaktivitesinin diabet, sham ve kontrol gruplarında sadece Leydig hücrelerinde görüldüğü, seminifer tubüllerde veya diğer testiküler yapılarda herhangi bir reaksiyon gözlenmedi. Leydig hücrelerindeki immunoreaktivite yoğunluğunun gruplara göre belirgin bir şekilde değiştiği gözlemlendi.

Kontrol ve sham gruplarında OTR immunoreaktivitesinin yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 8 ve 9).

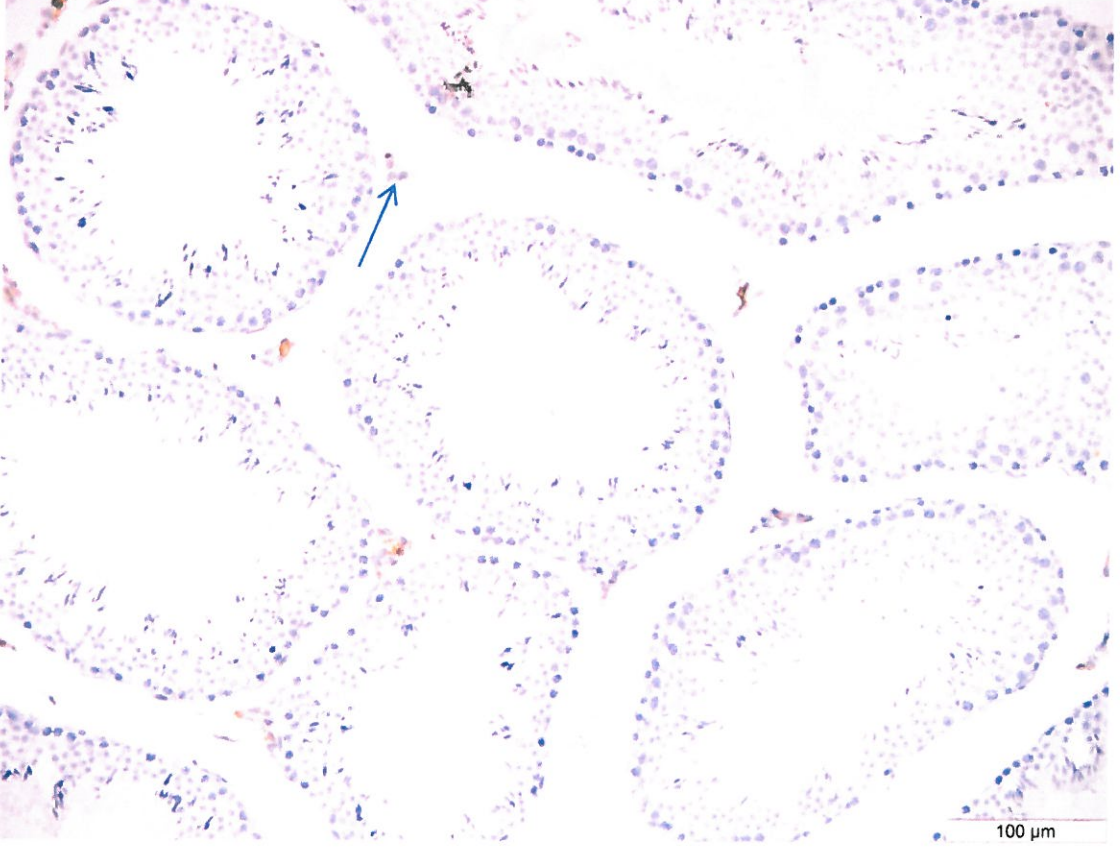


Şekil 8. Kontrol grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi. Ok: Leydig hücresi. Bar: 50 µm.

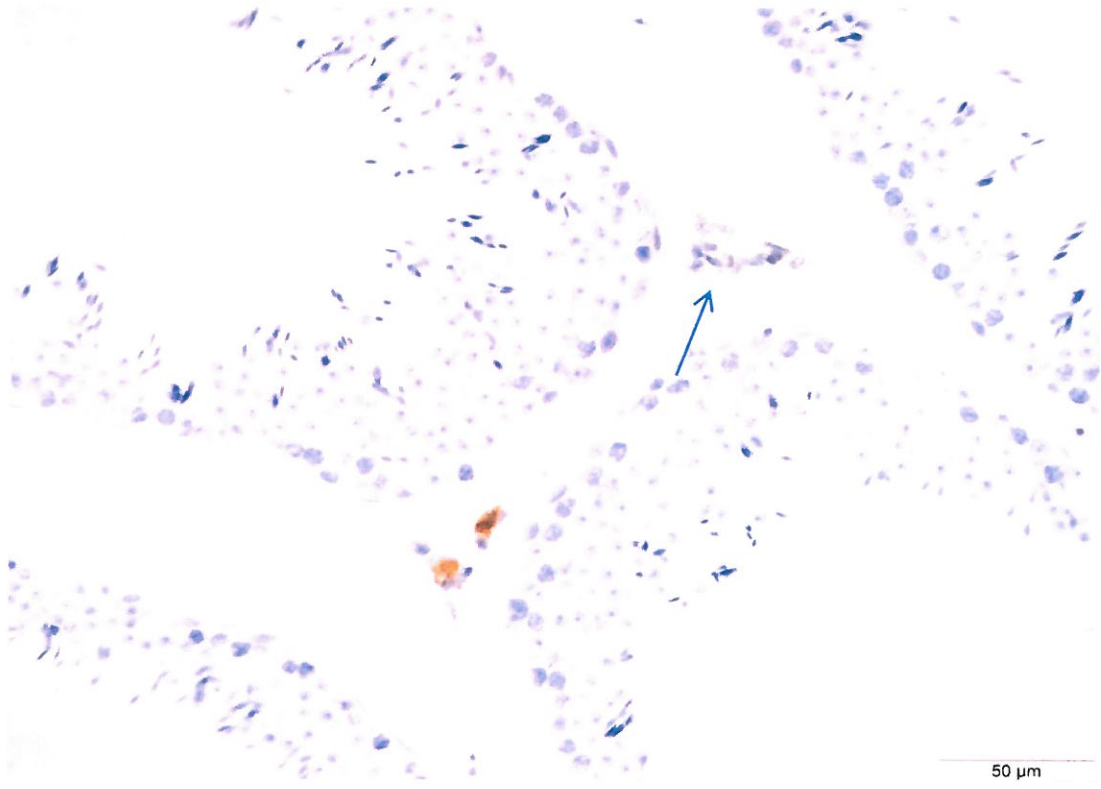


Şekil 9. Sham grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi. Ok: Tubulus seminiferus kontortus. Bar: 100 µm.

Deneme grubunda ise OTR immunoreaktivitesinin yine sadece Leydig hücrelerinde gerçekleştiği ve diğer gruplara göre çok az olduğu gözlemlendi (Şekil 10 ve 11).



Şekil 10. Diabet grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi. Ok: Leydig hücresi. Bar: 100 µm.



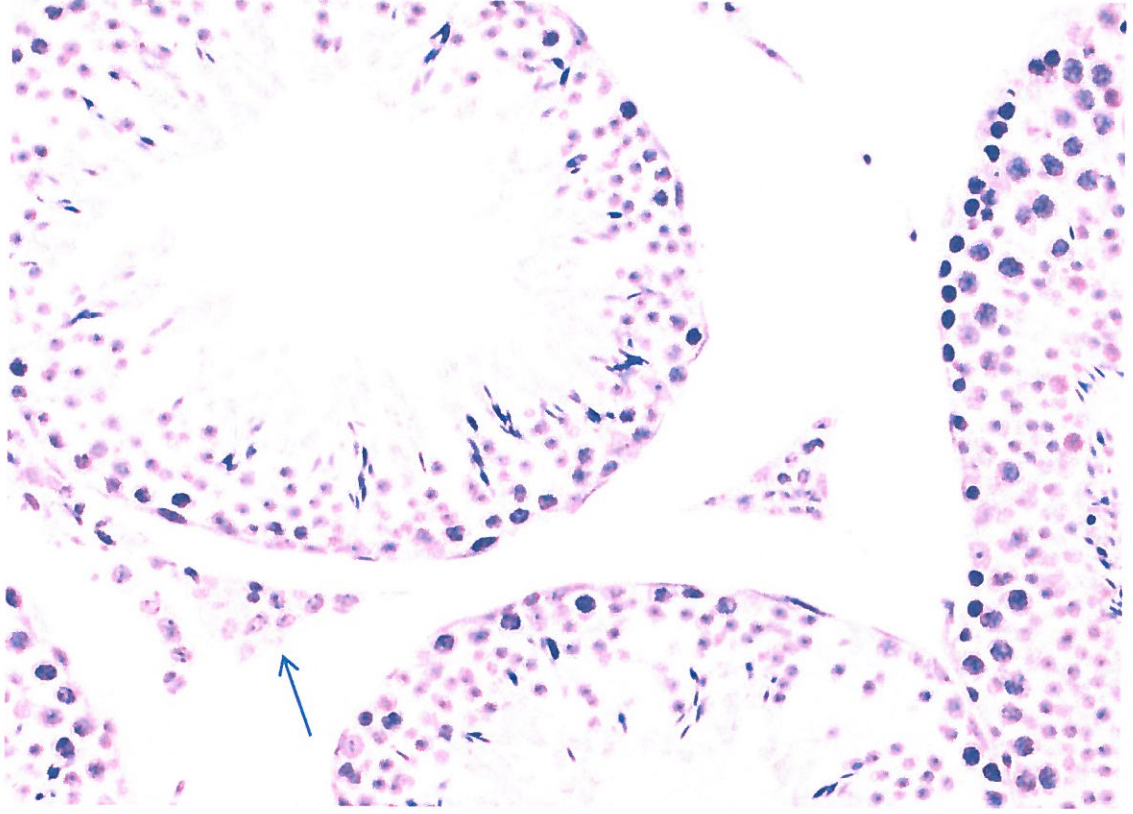
Şekil 11. Diabet grubu testis dokusunda OTR immunoreaktivitesi Ok: intersitisyel alan. Bar: 50 µm.

Tablo 9. Testisteki yapılar ve OTR reaksiyon yoğunluğu.

Testisteki Yapılar/Reaksiyon yoğunluğu	Kontrol	Sham	Diabet
Endotel Hücreleri	0	0	0
Spermatogonyum	0	0	0
Primer spermatosit	0	0	0
Sekonder spermatosit	0	0	0
Spermatid	0	0	0
Sertoli hücreleri	0	0	0
Leydig hücreleri	+3	+3	+1

0 : İmmunoreaktivite yok, +1: Az yoğun, +2: Orta derecede yoğun, +3: Çok yoğun.

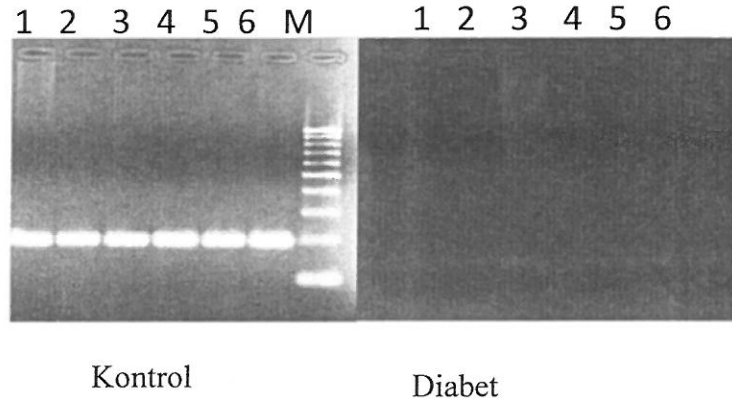
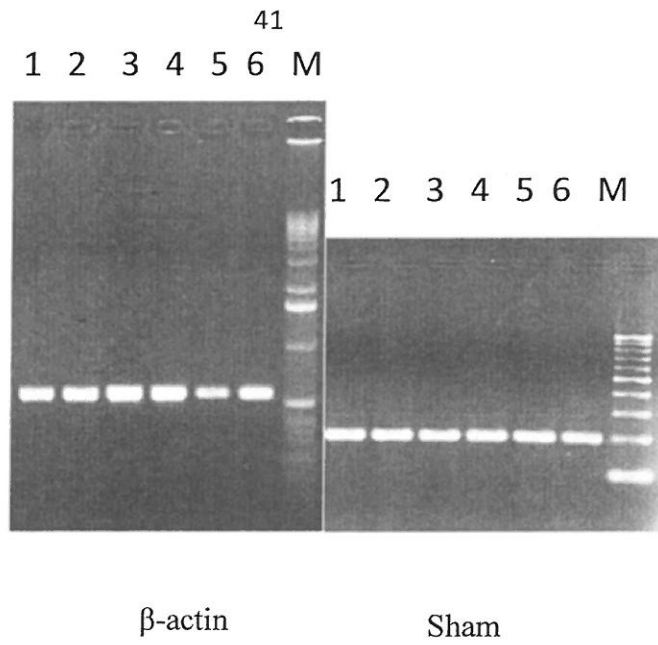
Testis dokusunda görülen OTR immünoreaktivitelerinin spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan negatif kontrol denemesinde uygulanan immunohistokimyal aşamalarının hepsi antikor ilave edilmeden aynı şekilde uygulandı ve OTR immünoreaktivitesinin spesifikliği değerlendirildi (Şekil 12).



Şekil 12. Kontrol grubu, Negatif kontrol. Ok: intersitisyel alan. Bar: 50 μ m.

4.6. Moleküler Analiz

Her üç gruptaki farelerin testis dokusundaki OTR ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle belirlendi. Kontrol geni olarak β -aktin geni kullanıldı. Graplardan elde edilen veriler gruplar arasında dansitometrik olarak ölçülerek bant yoğunluklarına göre değerlendirildi. Kontrol ve sham gruplarında bantların yoğunlukları benzerlik gösterirken diabet grubunda ekspresyonun daha az olduğu görüldü (şekil 13).



Şekil 13. PCR Jel görüntüleri

Aktin primeriyle kurulan PCR programından elde edilen örnekler jele yüklendi ve cDNA ekspresyonunda bir değişim olmadığı görüldü. OTR primerleri ile kurulan PCR programında elde edilen örnekler jele yüklendiğinde diabet grubu DNA ekspresyonunda diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma olduğu görüldü (Tablo10).

Tablo 10. OTR geni RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

Gruplar	N	RT-PCR (arbitrary unit) \pm SD	F
Diabet	6	0.4402 \pm 0.007 ^a	3538.94*
Sham	6	1.0097 \pm 0.156 ^b	
Kontrol	6	1.0058 \pm 0.156 ^b	

Farklı üst karakterler arasında anlamlı istatistiksel fark vardır. *P<0.05 (SD:Standart sapma, F: F değeri)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada STZ uygulanarak deneysel diabet oluşturulan farelerde; canlı ağırlık, testis ağırlığı, immunohistokimyasal olarak OTR'nin testis dokusundaki lokalizasyonu ve RT-PCR ile OTR'nin gen ekspresyonuna bakılmıştır.

Yotsumota ve ark. (1997), farelerde yaptıkları çalışmada 150 mg/dl STZ enjeksiyonuyla diabetin gerçekleştiğini ve hayvanların kan glikoz seviyesinin 400 mg/dl üzerinde olduğunu belirtmişlerdir. Mukherjee ve ark. (1998), ratlarda 55 mg/kg STZ enjekte ederek deneysel diabet gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Göçmen ve ark.(2000), ip olarak farelere 100 mg/kg STZ enjekte ederek diabetin gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Wada ve ark. (2001), farelere 200 mg/kg STZ nin tek dozda uygulanmasıyla diabetin gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Grover ve ark. (2001), farelerde 150 mg/kg STZ'nin ip olarak enjeksiyonuyla yine diabetin gerçekleştiğini ve kan glikoz seviyesinin 400 mg/dl olduğu belirtmişlerdir. Yang ve Wright (2002), farelere farklı oranlarda i.v. olarak STZ enjekte ettiklerini ve diabetin 150 mg/kg oranında gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Kanitkar ve Bhonde (2004), farelerde ip olarak 100 mg/kg STZ enjekte ettiklerini ve 24 saat sonra kan glikoz seviyesinin 297 mg/dl olduğunu bildirmişlerdir. Bingöl ve Kocamış (2010), farelere 100 mg/kg oranında tek doz olarak uygulanan STZ de diabetin gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada farelere ip olarak 100 mg/kg oranında STZ enjekte edildi ve deneysel diabet oluşturuldu.

Yang ve Wright (2002), kan glikoz seviyesi 200 mg/dl olan hayvanlarda deneysel diabetin gerçekleştiğini kabul ettiklerini belirtmişlerdir. Kanitkar ve Bhonde (2004) kan glikoz düzeyi 200mg/dl hayvanları yine diabet olarak kabul etmişlerdir. Bingöl ve Kocamış (2010), yaptıkları çalışmada kan glikoz seviyesi 200 mg/dl olan hayvanları diabet kabul etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara paralel olarak AKŞ değeri 200 mg/dl ve üzeri olan fareler diabet olarak kabul edildi.

Canlı Ağırlık ve Testis Ağırlığı

Göçmen ve ark. (2000), diabet yapılan farelerde 20. veya 30. günden sonra canlı ağırlıklarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Wada ve ark. (2001), diabet yapılan ve 24 hafta boyunca takip edilen hayvanlarda kilo kaybı görüldüğünü belirtmiştir. Aynı yıllarda yapılan bu çalışmanın aksine Grover ve ark. (2001), STZ uygulayarak deneysel diabet oluşturdukları farelerde herhangi bir şekilde kilo kaybı olmadığını bildirmişlerdir. Imaeda ve ark. (2002), deneysel diabetin farelerde canlı ağırlık kaybına neden olmadığını belirtmişlerdir. Nayon ve ark. (2004), deneysel diabet uyguladıkları farelerde 60 günde canlı ağırlık kaybı görüldüğünü bildirmişlerdir. Kim ve ark. (2006), deneysel diabet oluşturdukları ratlarda canlı ağırlık yönünden kontrol grubuna göre ciddi bir fark olduğunu gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Haan ve ark. (2005) diabetin fare canlı ağırlığında azalmaya neden olmadığını belirtmişlerdir. Orman ve ark. (2015), deneysel diabet yapılan farelerin canlı ağırlıklarında anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda diabetli grubun canlı ağırlığında son gün canlı ağırlığında ilk güne göre anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. Diabetin canlı ağırlığı gibi testis ağırlığında da azalmaya neden olduğu Jelodar ve ark. (2009), tarafından bildirilmiştir ancak çalışmamızda gruplar arasında testis ağırlıkları bakımından istatistiksel düzede anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Histolojik ve Histometrik Değerlendirme

Cameron ve ark. (1985), diabetik insan testis dokusunda seminifer tubüllerde spermatogenik hücrelerin azaldığını, seminifer tubül epitelinin kalınlaştığını, seminifer tubülde vakuolleşme ve atrofi görüldüğünü bildirilmiştir. Cai ve ark. (2000), Kanter ve ark. (2013), diabetik ratların seminifer tubüllerinde bozulmalar olduğunu ayrıca testis dokusunda seminifer tubüllerde spermatogenik hücrelerin azaldığını, seminifer tubül epitelinin kalınlaştığını, seminifer tubülde vakuolleşme ve atrofinin olduğunu bildirmişlerdir. Guneli ve ark. (2008), diabetin tubulus seminiferusun bazal membranında ve testis bazal membranında kalınlaşmaya neden

olduğu ve germ hücrelerinin dejenere olduğunu belirtmişlerdir. Akkoç ve ark (2012), diabetik grupta seminifer tubül bazal membranının kalınlaştığını bildirmişlerdir. Kanter ve ark. (2012), çalışmalarında kontrol grubunda seminifer tubüllerin normal gözlendiğini, diabetik sıçanlarda ise testis dokusunda seminifer tubüllerin yapısında küçülme ve bozulmalar olduğunu belirtmişlerdir. Kanter ve ark. (2012), Diabetik sıçanların spermatogenik hücre serilerinde önemli bir azalmanın olduğunu, tubüllerde ise atrofinin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Orman ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada kontrol grubuyla diabetik grubu karşılaştırdıklarında, diabetli grupta seminifer tubüllerinde vakuolleşme, atrofi ve germ hücrelerde dejenerasyon olduğunu ve çekirdeklerin normalden büyük olduğunu, ayrıca bazal membranda kalınlaşma olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada tüm gruplarda yapılan mikroskopik incelemeler sonucu kontrol, sham ve diabet grupları arasında testis dokusunun histolojik yapısı bakımından belirgin bir farklılık olmadığı görüldü.

Guneli ve ark. (2008), çalışmalarında diabet grubunda kontrol grubuna göre seminifer tubül çapında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Jelodar ve ark. (2009), çalışmalarında diabetli dişi sıçanlardan doğan erkek sıçanların seminifer tubül çaplarının düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların yanı sıra Soudamani ve ark. (2005), Akkoç ve ark. (2012), Kanter ve ark. (2012), Orman ve ark. (2015), yaptıkları çalışmalarda diabetin seminifer tubül çapında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Guneli ve ark. (2008), Ricci ve ark. (2009), Khaki ve ark. (2010), Kanter ve ark. (2012), diabetik sıçanların testis dokusunda seminifer tubüllerde yapısal bozulmalar, tubül boyutunda küçülme olduğunu bildirilmişlerdir. Yaptığımız çalışmada, testis dokusu seminifer tubul çapları bakımından incelendiğinde ortalama tubul çap değeri bakımından gruplar arasında anlamlı ($P < 0,05$) bir fark belirlendi. Diabet grubunda seminiferus kontortus çapında diğer gruplara göre belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir.

İmmünohistokimya ve Moleküler Analiz

OT'nin sperm üretimi sırasında kontraksiyonu sağladığı ve sperm hareketinde etkili olduğu bilinmektedir (Whittington ve ark. 2001). Vermançaneni ve ark. (1990) koyun testisinde OT lokalizasyonunu immünohistokimyasal olarak incelemiş ve spesifik reaksiyonlar olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaya paralel olarak, Harris ve ark. (1996), rat epididimisinde OT'in yine spesifik reaksiyonlar oluşturduğunu belirtilmiştir. Koyun maymun ve birçok memelide yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda OT'nin Leydig hücrelerinde bulunduğu belirtilmiştir (Frayne ve Nicholson 1998, Einspanier ve Ivell 1997, Guldenaar ve Pickering 1985, Ungefroren ve ark. 1994). Nicholson ve ark. (1994), ratların seminifer tubullerinde OT immünohistokimyasal olarak incelenmiş ve seminifer tubullerde hiçbir reaksiyonun olmadığı belirtilmiştir. Vermançaneni (1990), koyun testisinde OT'nin çok az reaksiyon gösterdiği belirtilmiştir.

OT'nin bütün etkilerinin ortaya çıkması ancak OTR'nin varlığıyla mümkündür. Einspanier ve Ivell (1997), Frayne ve Nicholson (1998), maymun epididimisin düz kas hücrelerinde OTR immünoaktivitesinin olduğunu belirtmişlerdir.

Einspanier ve Ivell (1997), maymun testisinde OT'i ve OTR'yi immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. OT varlığının sadece spermatogenez sırasında olduğunu, OTR'nin ise spermatogenezisten önce hatta puberte döneminden de önce Leydig hücrelerinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Einspanier ve Ivell (1997), maymun epididimisini immünohistokimyasal olarak incelemiş ve yetişkin maymunların epididimis miyoid hücrelerinde OTR immünoaktivitesinin olduğunu belirtmişlerdir. Frayne ve Nicholson (1998), insan testis dokusunda OTR'yi immünohistokimyasal açıdan incelemiş ve hem Leydig hücrelerinde hemde sertoli hücrelerinde reaksiyon olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada maymun testisinde inceleyip Leydig hücrelerinde OTR immünoaktivitesinin görüldüğünü ifade etmişlerdir. Whittington ve ark. (2001), koç testisinde yaptıkları çalışmada leydig ve sertoli hücrelerinde OTR immünoaktivitesinin görüldüğünü belirtmişlerdir. Li ve ark. (2012), rat penisinde OTR immünoaktivitesinin endotel hücrelerde ve arter

etrafındaki düz kas hücrelerinde görüldüğünü belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada OTR'nin insan prostat dokusunda stroma hücrelerinde (Frayme ve Nicholson 1998), OTR mRNA'sının ise pankreasın epitelyal hücrelerinde (Ivell ve ark. 2001), bulunduğunu belirtmişlerdir. Hem OT hem de OTR'nin rat prostatında epitelyum hücrelerinde bulunduğu ve bu hücrelerin gelişmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Plecas ve ark. 1992). Bizim çalışmamızda OTR immunoreaktivitesinin tübüllerde olmadığı sadece Leydig hücrelerinde olduğu görülmüştür. Peniste OTR düz kas hücrelerinde bulunmaktadır. Nicholson ve ark. (1994), invitro ortamda OTR'nin kontraksiyonu sağladığını belirtmişlerdir. Ratlarda OTR'nin penil ereksiyon üzerindeki etkisini RT-PCR yöntemiyle inceleyen Vignozzi ve ark. (2004), OTR'nin farklı ekspresyon oranlarında penil ereksiyonu farklı şekillerde etkilediğini bildirmişlerdir. Bathgate ve Sernia (1994), OTR geninin penisteki ekspresyonunun prostat ve testis dokularında da benzer seviyelerde olduğunu belirtmişlerdir.

Flippi ve ark. (2002), tavşan epididimisinde OTR'nin hem immunohistokimyasal hemde PCR yöntemiyle incelemişlerdir. Bizim çalışmamızda moleküler analiz bulgularına göre; OTR ekspresyonunun diabetli hayvanlarda kontrol ve sham gruplarına göre azaldığı görülmüştür.

SONUÇ

Çalışmamızda histolojik incelemeler sonucu, kontrol, sham ve diabet grupları arasında histolojik olarak belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Gruplar kendi içinde günlere göre karşılaştırıldığında diabet grubunda son gün canlı ağırlık ortalamasının ilk gün canlı ağırlık ortalamasından istatistiksel düzeyde farklı, diğer gruplarda ilk ve son gün canlı ağırlıkların benzer olduğu görüldü. Testis ağırlığının her üç grupta da istatistiksel düzeyde benzer olduğu belirlendi. Histometrik olarak ise diabet grubunda seminifer tubul çapının sham ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak azalmış olduğu tespit edildi. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda OTR immunoreaksiyonu kontrol ve sham gruplarında yoğun, diabet grubunda ise zayıf olduğu görüldü. Moleküler analiz sonucunun immunohistokimyasal sonuçları desteklediği görüldü. Yani diabet grubunda OTR az ekspre olurken sham ve kontrol gruplarında daha fazla ekspre edildiği görüldü.

Bu çalışmanın sonunda, diabet grubunda kontrol ve sham gruplarına göre bazı farklılıklar olduğu tespit edildi. Histolojik açıdan diabetle ilgili testis dokusunda birçok çalışma bulunmasına rağmen bu dokuda OTR immunohistokimyası ve gen ekspresyonu ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma; OTR, diabet ve testis dokusu üçgeninde önemli bir ilişki olduğunu göstermekle beraber OTR ekspresyonundaki düşüşün nedenini ve sonuçlarını bulunması için daha birçok çalışmanın yapılmasının gerektiğini göstermektedir.

Sonuç olarak OTR'nin başta infertilite olmak üzere diabetin erkek üreme sistemi üzerinde neden olduğu diğer bozuklukların düzeltilmesinde bir rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Agbaje IM, Rogers DA, Mcvicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C: Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod*, 22(7):1871-7, 2007.

Aitszuler N and Hamshire J: Oxytocin infusion increases plasma insüline and glucagon levels and glucose production and uptake in the dog. *Diabetes*, 30:112-114, 1981.

Akkoç H, Kelle I, Tunik S, Erdinc M, Erdinc L, Nergiz Y: Effects of Ethyl Pyruvate on Testicular Damage in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 8(1), 35-45, 2012.

Altay B, Çetinkalp S, DoğanavÇargil B, Hekimgil M, Semerci B: Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril*, 80(2):828-31, 2003.

Ammar A, Rejerison RM, Roeau S: Frog glomerular vasotocin reseptors resemble Mammalia V-1b reseptors. *American Journal of Physiology*, 267:1198-1208, 1994.

Anderson Hunt M, Dennerstein L: Oxytocin and female sexuality. *Gynecological and Obstetrical Investigation*, 40: 217-221, 1995.

Ang HL, Ungefroren H, De Bree F, Foo NC, Carter D, Burbach JP, Ivell R, Murphy D: Testicular oxytocin gene expression inseminiferous tubules of cattle and transgenic mice. *Endocrinology*, 128: 2110-2117, 1991.

Antoni FA: Oxytocin receptor in rat adenohypophysis: Evidence from radioligand binding studies. *Endocrinology*, 119:2393-2395, 1986.

Arıncı K, Elhan A: *Anatomi*. 3. baskı. 1. cilt. Ankara, Güneş Kitabevi, 2001.

Arletti R, Benelli A, Bertolini A: Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception *Neuropeptides*, 24:25-129. 1993.

Baccetti B, Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F: Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod*, 17(10):2673-7, 2002.

Bain S.C, Ann Kelly M, Mijovic CH Barnett AH: Genetic Factors in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Textbook of Diabetes 1*(eds. JC Pickup and G Williams) 3. ed. Blackwell Publishing; p. 15, 1-14, 2003.

Baldwin JM: The probable arangemet of the helices in 6 protein-coupled receptor. *Journal*, 12:1693-1709, 1993.

Başkal N: *Diabetes Mellitus Tanım, Klasifikasyon, Tanı, Klinik, Laboratuar ve Patogenez*, 3. Baskı. Ankara, Baran Ofset 2003.

Bathgate RA Sernia C: Characterization and localization of oxytocin receptors in the rat testis. *Journal of Endocrinolog*, 141 343–352,1994.

Berndtson WE Igboeli G: Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin J. *Reprod Fert*. 82:467- 475, 1988.

Bingöl SA ve Kocamış H: Sağlıklı ve Diabet Oluşturulmuş Farelerin Böbrek Dokusunda Katalaz Enziminin RT-PCR ile Gen ve İmmunohistokimyasal Olarak Protein Ekspresyonu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*.16 (5): 825-834, 2010.

Bliss M: *The Discovery of Insulin*. University of Chicago Press, Chicago, USA, 2000.

Bossmar T, Forsling M, Kerlund M: Circulating oxytocin and vasopressin is influenced by ovarian steroid replacement in women. *Acta Obstetrica et Gynecologica. Scandinavica*, 74: 544-548, 1995.

Cabadak H: Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3):51-61, 2008.

Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S: Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urological research*, 28(5): 342-347, 2000.

Cameron DF, Murray FT, Drylie DD: Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *The Anatomical Record*, 213(1): 53-62,1985.

Candegir Y, Temel Y, Gazi I: Diabetes Mellitus'un tarihçesi. In: *Diabetes Mellitus.Gri Tasarım*, 13-15, 2000.

Carlson MB: *Human Embryology and Developmental Biology*. 4rd. Ed. China, Mossby, 2009.

Carmichael MS, Warburton VL, Dixen J, Davidson JM: Relationships among cardiovascular muscular and oxytocin responses during human sexual activity. *Archives of Sexual Behaviour*, 23: 59-79, 1994.

Carter CS: Oxytocin and sexual behavior. *Neurosci and Biobehav Reviews*,16:131,1992.

Cassoni P, Sapino A, Stella A, Fortunati N, Bussolati G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. *Int J Cancer*, 77:695-700, 1998.

Chang KC, Tseng CD, Wu MS, Liang JT, Tsai MS, Cho YL: Aminoguanidine prevents arterial stiffening in new rat model of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest*, 36(8):528-35, 2006.

Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad M.F: Hypovitaminosis D: is associated with insülin resistance and β cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*, 79:820-5, 2004.

Coşkun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat panceas. *Pharmacol Res*.51(2):117-23, 2005.

Dahl-Jørgensen K, Joner G, Hanssens KF: Relationship Between Cow's Milk Consumption and Incidence of IDDM in Childhood. *Diabetes Care*,14: 1081-1083, 1991.

Dinçer S: Leptin ve Oksidatif Stres. Çocuk ve Ergen Obezite Derneği II. Leptin Kongresi Özet Kitabı s.56-8, Ankara, 2004.

Du Vigneaud V: Trail of sulfur research: From insulin to oxytocin. *Science*, 123:967-974, 1956.

Einspanier A, Ivell R: Oxytocin and receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biol Reprod*, 56:416-422, 1997.

Elands J, Resink A, De Kloet ER: Oxytocin receptors in the rat thymic gland. *Eur J Pharmacol*, 151:345-352,1990.

Erdoğan G: Diabetes mellitusun tedavisi 1. baskı. Bilimsel tıp yayınevi Ankara, 1997.

Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. Malatya: Pelikan Yayıncılık, 253-69, 2004.

Favaretto AVL, Ballejo GO. Albuquerque-Araujo WIC: Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action peptides, 18: (9).1377-1381.1997.

Flippi S, Vannelli G, Granchi S, Luconi M, Crescioli C, Mancina R, Natali A, Brocchi S, Vignozzi L, Bencini E, Noci I, Ledda F, Forti G: Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*,193: 89-100, 2002.

Frayne J and Nicholson HD: Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod*,4: 527-532, 1998.

Foo NC, Carter D, Murphy D, Ivell R: Vasopressin and oxytocin gene expression in rat testis. *Endocrinology*, 128: 2118-2128, 1991.

Gartner LP, Hiatt J. *Colour Text Book of Histology*, 1 th ed. Philadelphia:W. B.Saunders Company, p 458, 2000.

Geenen V, Legros JJ, Franchimont P: The neuroendocrine Tymus Coexistence of oxytocin and neurophysin on the human tymus. *Science*, 232:508-511.1986.

Grover J.K, Vats V, Rathi S, Dawar R: Traditional indian antidiabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 76:233-238,2001.

Guldenaar SEF, Pickering BT: Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in the rat testis. *Cell Tissue Res*, 240:485-487,1985.

Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N: Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *European Surgical Research*, 40(4): 354-360, 2008.

Gorbulev V, Burchner H, Akhundova A: Molecular cloning and functional characterization of V2 vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *European Journal of Biochemistry*, 215:1-7, 1993.

Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM: Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 94: 11704-11709, 1997.

Göçmen C, Seçilmiş A, Kumcu E.K, Ertuğ P.U, Önder S, Dikmen A: Effect of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelial relaxation of corpus cavernosum in the diabetic mouse. *European Journal of Pharmacology*. 398:93-98, 2000.

Haan J.B, Stefanovic N, Paterson D.N, Scurr L.L, Croft K.D, Mori TA: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin induced diabetic nephropathy. *Am J. Physiol Renal Physiol*, 289:544-551, 2005.

Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto A, Gutkowska J, McCann SM, Antunes J: Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat *Proc Natl Acad Sci*. 92:7902-7906, 1995.

Harris GC, Frayne J, Nicholson HD: Epididymal oxytocin in the rat: its origin and regulation. *Int J Androl*, 19:278-286, 1996.

Hatemi H: Diabetes Mellitusun Tarihçesi. *Aktuel Tıp Dergisi* 7: 497-499, 1996.

Herbert J: Oxytocin and several behavior. *British medical J*, 309: 811-892, 1994.

Howl J, Rudge SA, Lavis RA, Davies AR, Parslow RA, Hughes PJ, Kirk CJ, Michell RH, and Wheatley M: Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: receptor structure, signal transduction, and developmental regulation. *Endocrinology* 136: 2206-2213, 1995.

Iliçin G, Ünal S, Biberöglü K, Akalın S, Süleymanlar G: *Temel İç Hastalıkları*, Cilt 2. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 1-5, 1997.

Insel TR: Oxytocin, a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology* 17: 3-35, 1992.

Ivell R, Kimura T, Muller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs A: The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Exp Physiol*, 86:28-296, 2001.

Imaeda A, Kaneko T, Aoki T, Konko Y, Nagase H: DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food and Chemical Toxicology*, 40:979-987, 2002.

İmamoğlu Ş, Akalın S, Yılmaz TM: Diabet ve Siz. İstanbul Ceren Tanıtım Ltd. Şti, 1995.

Jelodar G, Khaksar Z, Pourahmadi M: Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. *The Journal of Physiological Sciences*, 59(5): 377-382, 2009.

Junqueira LC, Carneiro J: (Çeviri: Y. Aytakin, S. Solakoğlu). *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 418-34, 2009.

Kanitkar M ve Bhone R: Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *The Review of Diabetic Studies*, 1(4): 185, 2004.

Kanter M, Uysal H, Karaca T, Ozdemir Sagmangil H: Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic β -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Toxicol*, 80(6):362-9, 2006.

Kanter M, Aktas C, Erboğa M: Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and chemical toxicology*, 50(3): 719-725, 2012.

Kanter M, Aktas C, Erboğa M: Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular nutrition and food research*, 57(9): 1578-1585, 2013.

Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki AA, Maleki NA, Khamnei HJ, Ahmadi P: Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, 24(9): 1285-1291, 2010.

Kasahara Y, Sato K, Takayanagi Y, Mizukami H, Ozawa K, Hidema S, So KH, Kawada T ve Inoue N: Oxytocin Receptor in the Hypothalamus Is Sufficient to Rescue Normal Thermoregulatory Function in Male Oxytocin Receptor Knockout Mice. *Endocrinology*, 154: 4305-4315, 2013.

Kayalı H: Özel histoloji. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, İstanbul, 218-28, 1989.

Kim NK, Stankovic M, Cushman TT, Goldstein I, Munarriz R, Traish AM: Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, Morphology and Biochemical Markers. *BMC Physiology*, 6(4):1-9, 2006.

Kimura T, Tanizawa O, Mori K: Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*, 356:526-529, 1992.

Knudtzon J: Acute effect of oxytocin and vasopressin on plasma levels of glukagon, insulin and glucose in rabbits. *Horm Metabol Res*. 15:103-104, 1983.

Knight T: The effect of oxytocin and adrenalin on the semen output of ram. *J. Reprod Fert*, 39:329-336, 1974.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA: Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*, 27(3):450-2,2006.

Kök, D: Deneysel diabet oluşturulan ratların böbrek dokusu oksidan ve antioksidan durumu üzerine likopenin etkisi, Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, 73s. 2011.

Kuran O. Sistemik anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul, 512-4,1983.

Langtry HD, Balfour JA: A review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Review*, 55(4):563-84, 1998.

Lenzen S, Tiedge M, Jorns A, Munday R: Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: *Lessons from Animal Diabetes*. Ed: E. Shafir. Birkhauser, Boston, 113-122,1996.

Li M, Wang T, Guo S, Rao K, Liu J, Ye Z: Ekspresion of okitosin Reseptor in diabetic rat penis. *Andrologia*, 44:716-720, 2012.

Mac Farlane A.J and Scott F.W: *Environmental Agents and Type 1 Diabetes*. Testbook of Diabetes 1 (eds JC Pickup and G Williams) 3rd Blacwell Publishing, 17. 1-16, 2003.

Martens H, Goxe B, Geenen V: The thymic repertoire of neuroendocrine self-antigens: physiological implications in T-cell life and death. *Immunology Today*,17: 312-317, 1996.

Melis Mr, Argiolas A, Gessa GI: Oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain. *Brain Res*. 398: 259-265, 1986.

Metzger BE: Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes*,2:197-20,1991.

Mineo H, Ito M, Muto H, Kamita H: Effect of oxytocin arginine-vasopressin and lysine-vasopressin on insüline and glucagon secretion in sheep. *Res in Veterinary Science*, 62:105-110.1997.

Moore KL, Persaud TVN: *The Developing Human*.8th.Ed. China, Saunders, 2007.

Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R: Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed and Pharmacother*, 52:89-95, 1998.

Mythili MD, Vyas R, Akila G, Gunasekaran S: Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc Res Techniq*. 63: 274-281, 2004.

Nayon T, Yalçınkaya AS, Şekeroğlu MR, Dülger H, Balaharoğlu R: Antioxidant effect of pentoxifylline and melatonin in the alloxane induced diabetic mice. *Türk Biyokimya Dergisi*. 20(4):268-272, 2004.

Nicholson HD, Swann RW, Burford GD, Wathes DC, Porter DG, Pickering BT: Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. *Regulatory Peptides*, 8: 141-146,1984.

Nicholson HD, Greenfield HM, Frayne J. The effect of germ cell complement on the presence of oxytocin in the interstitial and seminiferous tubule fluid of the rat testis. *J Endocrinol*,143:471-478,1994.

Nicholson HD, Jenkin L: Oxytocin and prostatic function. *Adv Exp Med Biol*,395: 529-538, 1995.

Nicholson HD, Jenkin L: 5 α -Reductase activity is increased by oxytocin in the rat testis. In: Bartke A (ed) *Function of somatic cells in the testis*. Springer, Berlin Heidelberg NewYork, pp 278–285,1994.

Olgun N: Hipoglisemi ve hiperglisemi. *Diabet Hemşireliği İstanbul,Tavaslı Matbaacılık*, 2002.

Orman D, Vardı N, Ateş B, Taşlıdere E, Elbe H: Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubules damage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tissue Cell*, 47(3): 284-290, 2015.

Özkorkmaz EG: Streptozotosin diabetik ve benfluoreks-C vitamini tedavili sıçanların mesan dokusunda histolojik incelemeler, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 87s. 2008.

Parry LJ, Bathgate RA: Mesotocin receptor gene and protein expression in the prostate gland, but not testis, of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. *Biol Reprod*,59: 1101–1107, 1998.

Petty MA, Lang RE, Unger T and Ganten D: The cardiovascular effect of oxytocin in conscious male rats. *Eur J Pharmacol*, 112:203-210,1985.

Plecas B, Popovic A, Jovovic D, Hristic M: Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats. *J Endocrinol Invest*, 15:249-253,1992.

Pitman RK, Lasko NB: Effects of intranasal vasopressin and oxytocin on physiologic responding during personal combat imagery in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Research*, 48:107-117,1993.

Popkin MK, Callies AL, Lentz RD, Colon EA, Sutherland DE: Prevalence of major depression, simple phobia, and other psychiatric disorders in patients with long-standing type 1 diabetes. *Arch Gen Psychiatry*, 45:64-68,1988.

Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S: Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol Rep*,57(1):90-6,2005.

Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M: Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia*, 41(6): 361-368, 2009.

Rodrigues B, Poucheret P, Battell ML, McNeill JH: Streptozocin-induced diabetes induction, mechanism and dose dependency. In; *Experimental Models of Diabetes*. Ed. McNeill J.H. CRC Press LLC, Boca Raton, p.3-4,1999.

Rogers RC and Herman GO: Oxytocin antagonist, TRH and hypothalamic paraventricular nucleus stimulation effects on gastric motility. *Peptides* 8: 505-513,1987.

Ross HM, Pawlina W: *Histology A Text And Atlas*. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 728-48,2006.

Roth KI: Diabetes Treatment Bridging The Divide. *N Engl J Med*. 356: 1499-501,2007.

Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH: Structure characterization and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 92:200-204,1995

Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). *Langman's medical embryology*. 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 274-5,1996

Sadler TW. *Langman medical embryology*. Başaklar AC (Çev). 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2007.

Sancak B, Cumhuriyet M: *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve iç Organlar*. 4. baskı. Ankara, ODTÜ Yayıncılık, 2008.

Sanguinetti RE, Ogawa K, Kurohmaru M, Hayashi Y: Ultrastructural changes in Mouse Leydig cells after streptozotocin administration. *Exp Anim*, 44(1):71-3,1995.

Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S: Population-based Study of Diabetes and Risk Characteristics in Turkey. Results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25:1551-6, 2002.

Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N: Twelve-year Trends in the Prevalence and Risk Factors of Diabetes and Prediabetes in Turkish Adults. *Eur J Epidemiol*, 28:169-80,2013.

Schein PS, Cooney DA, Vernon ML: The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res*. 27:2324-2332,1967.

Scott FW, Norris JM, Kolb H: Milk and Type 1 Diabetes: Examining The Evidence and Broadening The Focus. *Diabetes Care*,19: 379-83,1996.

Schmidt A, Jard S, Dreifuss JJ: Oxytocin receptors in rat kidney during development. *American Journal of Physiology*, 59:872-881,1990

Scobie IN: *Acute complications of diabetes an atlas of diabetes mellitus*, The Parthenon publishing, Newyork, 22-29, 1998.

Sceibold A, Brabet P, Rosenthal W: Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene. *American Journal of Human Genetics*,51:1078-1083,1992.

Shu S, Ju G, Fan L: The glucose oxidase-dab –nickel in peroksidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Left*, 85:169-171,1988.

Sodeman W.A: *Pathologic Physiology mechanisms of disease*. Çevirenler: V.Cesur, N.Kemal.I.Baskı, Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri yayınevi, Ankara 1992.

Smith R: "Parturition," *The New England Journal of Medicine*, vol. 356, (3): 271–283, 2007.

Snell RS. *Clinical anatomy*. 3rd ed. Boston: Brown and Company, 168-75,1986.

Soloff MS, Fernstom MA, Fernstom MJ: Vasopressin and oxytocin reseotor on plasma membranes from rat mamary gland. *Biochemistry and cell Biology* 67:152-162,1989.

Soudamani S, Malini T, Balasubramanian K: Effects of streptozotocin-diabetes and insulinreplacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocrine research*, 31(2): 81-98, 2005.

Sulu N, Uzun M, Sel T and Çınar A: Effect of intravenous injection of oxytocin on plasma levels of insülin and glucose in dairy cows, *Israe J of Veterinar Medicin*. 54:(4).118-121,2002.

Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50: 536-546,2001.

Tribolret E, Barberis C, Jard S: Localization and pharmacological characteriation of high affinty binding sites for vasopressin onoxytocin inthe rt brain by ligt mikroskopik autoradiography. *Brain Research*,442:105-118,1988.

Ungefroren H, Davidoff M, Ivell R. Post transcriptional block in oxytocin gene expression within the seminiferous tubules of the bovine testis. *J Endocrinol*, 140:63-72,1994.

Veermanchaneni RDN, Amann RP. Oxytocin in the ovine ductuli efferentes and caput epididymis: immunolocalization and endocytosis from the luminal fluid. *Endocrinology*, 126:1156–1164. 1990.

Vignozzi L, Filippi S, Luconi M, Morelli A, Mancina R, Marini M, Vannelli GB, Granchi S, Orlando C, Gelmini S, Ledda F, Forti G & Maggi M. Oxytocin receptor is expressed in the penis and mediates an estrogen-dependent smooth muscle contractility. *Endocrinology*, 145,1823–1834, 2004.

Yang H, Wright J.R: Human β cells are exceedigly resistant to streptozotocin in vivo. *Endocrinology*. 143(7): 2941-2945,2002.

Yoon JW, Jun HS: Viruses in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Textbook of Diabetes I*. (eds. J. C Pichup and G Williams) 3rd ed.Blackwell Publishing, 16.(4) 1-16, 2003.

Yotsumoto T, Naitoh T, Shikada K, Tanaka S: Effects of spesific antogonist of angiotensin II reseptors and captopril on diabetic nephropathy in mice. *Jpn J. Pharmacol*, 75:59-64,1997.

Zimmet P, Taft P, Thoma K: The high prevalence of Diabetes mellitus on a central Pasific Island. *Diabetologia*,13: 111-115,1997.

Wada J, Zhang H, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Hida K, Shikata K: Gene expression profile in streptozotocin-induced diabetic mice kidneys undergoing glomerulosclerosis. *Kidney International*. 59:1363-1373, 2001.

Wallin LA, Fawcett CP and Rosenfeld CR: Oxytocin stimulates glucagon and insulin secretion in fetal and neonatal sheep. *Endocrinology*. 125:2289-2296, 1996.

Whittington K, Assinder SJ, Parkinson T, Lapwood KR, Nicholson HD: Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction*, 122:317-325, 2001.

7. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Hatay'da doğdum. İlköğretim, ortaokul ve lise eğitimimi Hatay'da tamamladıktan sonra Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü 2013 yılında tamamladım. 2014 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladım.