

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE DİABETİK RATLARDA MELATONİN
UYGULAMASININ TESTİS DOKUSUNDA GDF-9 ve
KATALAZIN İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Buket USTA

Danışman

Doç. Dr. Turgay DEPREM

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS 2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE DİABETİK RATLARDA MELATONİN
UYGULAMASININ TESTİS DOKUSUNDA GDF-9 ve
KATALAZIN İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ

Buket USTA

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Turgay DEPREM

Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2015-TS-72

KARS 2016

TC
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Programı çerçevesinde Buket USTA tarafından hazırlanmış olan 'Sağlıklı ve Diabetik Ratlarda Melatonin Uygulamasının Testis Dokusunda GDF-9 ve Katalazın İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu Üzerine Etkisi' adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ..birliği..... ile .. kabul..... edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: ..14.../..12.../..2016

Adı Soyadı:

İmza:

Başkan: ..Prof.Dr.Sahin...ASLAN

Üye: ..Doc.Dr. Aytaç...KÜRÜM

Üye: ..Doc.Dr. Turgay...DEPREM

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

Prof.Dr. M.Ökan ARSLAN
Enstitü Müdürü V.

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	V
ÖNSÖZ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.2. Diabetes Mellitusun' un Çeşitleri.....	2
1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	3
1.2.2.1. Endojen Antioksidanlar.....	5
1.2.2.2. Eksojen Antioksidanlar	5
1.2.3. Melatonin	6
1.2.4. Katalaz (CAT).....	7
1.3. Büyüme Faktörleri	8
1.3.1. Büyüme Farklılaşma Faktörü (GDF-9).....	9
1.4. Erkek Genital Sistemi	11
1.5. Diabetes Mellitus, Erkek Genital Sistemi, Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri	14
2. MATERYAL ve METOD	20
2.1.MATERYAL	20
2.1.1.Deney Hayvanı Materyali	20
2.2.METOD	21
2.2.1. Streptozotosin ile Diabet Oluşturulması	21
2.2.2. Melatonin Uygulaması.....	21
2.2.3. Canlı Ağırlık Ölçümü.....	21
2.2.3. Kan- Glikoz Değerlerinin Ölçümü.....	22
2.2.4. Testis Örneklerinin Alınması	22
2.2.5. Histolojik İncelemeler.....	22
2.2.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler	22
2.2.7.İstatistiksel Analiz.....	24

3.BULGULAR	25
3.1.Canlı Ağırlık Bulguları	25
3.2. Testis Ağırlık Bulguları.....	25
3.3. Tubulus Seminiferus Kontortus Çap Bulguları.....	28
3.4. Kan- Glikoz Değeri	28
3.5. Histolojik Değerlendirme Bulguları.....	29
3.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları.....	32
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	40
5. KAYNAKLAR	48
6.ÖZGEÇMİŞ	56



SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CAT: Katalaz

CuZn-SOD: Bakır Çinko Superoksit Dismutaz

DAB: Diaminobenzidin

DNA: Deoksiribonukleik Asit

Fe-SOD: Demir Superoksit Dismutaz

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

GDF-9: Büyüme Farklılaşma Faktörü

GnRH: Gonadotropin Salıverici Hormon

GPx: Glutasyon Peroksidaz

H&E.: Hematoksilen Eosin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

i.p.: İntraperitoneal

LH: Luteinleştirici Hormon

Mn-SOD: Mangan Superoksit Dismutaz

NAT: N-Asetiltransferaz

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

O²⁻: Superoksit

HO⁻: Hidroksil

PAS: Periyodik Asit Shift

PBS: Fosfat Buffer Salin

RNA: Ribonukleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SD: Standart Sapma

SOD: Superoksit Dismutaz

µm: Mikrometre

TABLULAR DİZİNİ**Sayfa No:**

Tablo 1. Kaynaklara göre antioksidanlar	6
Tablo 2. Deney grupları ve yapılan uygulamalar	20
Tablo 3. Dokulardaki GDF-9 ve CAT immunoreaktivitesi	23
Tablo 4. Kontrol grubu içerisinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırılması	25
Tablo 5. Diabet grubu içerisinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırılması	25
Tablo 6. Melatonin grubu içerisinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırılması	26
Tablo 7. Diabet+ melatonin grubu içerisinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırılması	26
Tablo 8. Tüm grupların canlı ağırlıkları günlere göre karşılaştırılması	26
Tablo 9. Testis ağırlıklarının tüm gruplar içerisinde karşılaştırılması	27
Tablo 10. Tubulus seminiferus kontortus çap değerinin gruplar arası karşılaştırılması	28
Tablo 11. Kan-glikoz düzeyinin gruplar arası karşılaştırılması	29
Tablo 12. Testisdeki yapılar ve GDF-9 reaksiyon yoğunluğu	32
Tablo 13. Testisdeki yapılar ve CAT reaksiyon yoğunluğu	36

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Şekiller Dizini	Sayfa No:
Şekil 1. Tubulus seminiferus kontortus	14
Resim Dizini	
Resim 1. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü	30
Resim 2. Melatonin grubu testis dokusunun histolojik görünümü	30
Resim 3. Diabet grubu testis dokusunun H&E boyama histolojik görünümü	31
Resim 4. Diabet+melatonin grubu testis dokusunda Pas boyama histolojik görünümü	31
Resim 5. Diabet grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi	33
Resim 6. Melatonin grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi	33
Resim 7. Diabet+melatonin grubu testis GDF-9 immunoreaktivitesi	34
Resim 8. Kontrol grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi.	34
Resim 9. Kontrol grubu testis dokusunda negatif GDF-9 immunoreaktivitesi	35
Resim 10. Diabet grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	37
Resim 11. Melatonin grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	37
Resim12. Diabet+melatonin grubu testis katalaz immunoreaktivitesi.	38
Resim 13. Kontrol grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi.	38
Resim 14. Kontrol grubu testis dokusunda negatif katalaz immunoreaktivitesi.	39

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım olmak üzere Doç. Dr. Turgay DEPREM' e eğitimim ve araştırmam süresince benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Prof. Dr. Şahin ASLAN' a, eğitimim süresince katkılarından dolayı Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI, Yrd. Doç. Dr. Serap KORAL TAŞÇI' ya, tez dönemim boyunca bana destek olan bölümdeki sevgili arkadaşlarıma, sağladığı finansmandan ötürü Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de bana sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyen ve bana sabırlarını sunan sevgili aileme, yüksek lisansa başladığım yıl benim en büyük sevincim ve uğurum Mustafa Tuna AYDOĞDU'ya, tez dönemimde benden hiçbir desteği esirgemeyen sevgili hayat arkadaşım, eşim Yılmaz USTA'ya çok teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışma, sağlıklı ve diabetik ratlarda melatonin uygulamasının testis dokusunda katalaz (CAT) ve GDF-9'un immunohistokimyasal dağılımını üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada 40 adet *Sprague-Dawley* rat kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin olarak dört gruba ayrıldı. Diabet oluşturmak amacıyla STZ, 50 mg/kg dozda intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı. Diabet oluşumu teyit edildikten sonra melatonin ve diabet+melatonin gruplarına melatonin 10 mg/kg dozunda (i.p.) 2 hafta süreyle uygulandı. Deneklerin testis dokuları 15. günde alındı. Alınan doku kesitlerine histolojik yapısını incelemek amacıyla H&E, PAS ve Crossman'ın üçlü boyaması yapıldı. GDF-9 ve CAT'ın immunoreaktivitesini belirlemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) metodu uygulandı.

Yapılan histolojik incelemeler sonucu kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin grupları arasında histolojik olarak bir farklılık gözlenmedi. Canlı ağırlık yönü ile kontrol ve melatonin grubunun istatistiksel düzeyde benzer olduğu ve diabet+melatonin grubuna göre ise bu iki grupta canlı ağırlığın artmış olduğu gözlemlendi. Diabet grubunda ise canlı ağırlığın diğer gruplara göre azaldığı tespit edildi ($P<0.05$). Testis ağırlığının kontrol grubunda en yüksek, melatonin ve diabet+melatonin gruplarında istatistiksel düzeyde benzer olduğu, diabet grubunda ise diğer gruplara göre azaldığı belirlendi ($P<0.05$). Gruplar arasında seminifer tubül çapının en az diabet grubunda olduğu tespit edildi. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda, tüm gruplarda GDF-9'un benzer özellikte immunoreaktivite gösterdiği, immunoreaktivitenin özellikle Leydig hücrelerinde olduğu, melatonin uygulamasının diabetik grupta GDF-9 immunoreaktivitesini azalttığı görüldü. CAT immunoreaktivitesinin melatonin ve diabet+melatonin gruplarına göre diabette daha yoğun olduğu gözlemlendi. CAT immunoreaktivitesi Leydig hücrelerinde sitoplazmik ve nükleer olduğu, spermatogenetik hücre hattında primer ve sekonder spermatositlerde ise çekirdeğe eklenik odaklar halinde yoğun immunoreaktivite sergilediği belirlendi.

Bu çalışmanın diabetli canlıların testis dokusunda antioksidanlar ve büyüme faktörleri arasındaki ilişkinin anlaşılmasına yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Diabet, Melatonin, GDF-9, Katalaz (CAT), İmmunohistokimya, Testis.



SUMMARY

This study was conducted to determine the effects of melatonin administration on the immunohistochemical distribution of catalase (CAT) and GDF-9 in testicular tissue in healthy and diabetic rats.

In the study, 40 Sprague-Dawley rats were divided into four groups, namely control, diabetes, melatonin and diabetes+melatonin. Streptozotocin was administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 50 mg / kg to induce diabetes. After confirmation of diabetes, melatonin and diabetes + melatonin groups were administered melatonin at a dose of 10 mg/kg (i.p.) for 2 weeks. Testicular tissues of the subjects were removed on day 15. H&E, PAS and Crossman's triple staining were performed to examine the histological structure of the tissue sections. The Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) method was used to determine the immunoreactivity of GDF-9 and CAT.

Histological examinations revealed no histological difference between control, diabetes, melatonin and diabetes + melatonin groups. It was observed that the control and melatonin groups were similar at the statistical level in terms of live weight and that the live weight was increased in these two groups compared with diabetes + melatonin group. In the diabetes group, the body weight decreased in comparison with the other groups ($p < 0.05$). Testicular weight was found to be highest in the control group, statistically similar in the melatonin and diabetes + melatonin groups, and was lower in the diabetes group compared to the other groups ($p < 0.05$). It was determined that the diameter of the seminiferous tubules was smallest in the diabetes group among the groups. Immunohistochemical studies showed that GDF-9 showed similar immunoreactivity in all groups, immunoreactivity was observed especially in Leydig cells, and melatonin treatment decreased GDF-9 immunoreactivity in the diabetes group. CAT immunoreactivity was observed to be more intense in the diabetes group than in the melatonin and diabetes+melatonin groups. CAT immunoreactivity was demonstrated to be cytoplasmic and nuclear in Leydig cells, and intense focal immunoreactivity, which was adherent to the nucleus, was observed in the primary and secondary spermatocytes in the spermatogenic cell line.

We think that this study can help to understand the relationship between antioxidants and growth factors in testicular tissue of patients with diabetes.

Keywords: Diabetes, Melatonin, GDF-9, Catalase (CAT), Immunohistochemistry, Testis.



1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Diabet (Diabetes Mellitus (DM)), global dünyayı tehdit eden en büyük sağlık problemlerinden birisidir ve her geçen gün yaygınlığı artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2011 yılında yayınlanan raporlarda, günümüzde dünyada 366 milyon kişinin DM' den etkilendiği, ancak bu sayının 2030 yılında yaklaşık 552 milyon kişiye çıkabileceği bildirilmiştir (Whiting ve ark. 2011). DM' nin artmasındaki en büyük nedenler arasında obezite, ömür süresinin artması ve hareketsizlik olduğunu ileri sürülmüştür (Agbaje ve ark. 2007).

Diabet; karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında sonuçlanan endokrin ve metabolik bir hastalıktır. DM' un çeşitli organlarda uzun süreli hasar, fonksiyon bozukluğu ve yetersizliği gibi etkileri bulunmaktadır (Rişvanlı ve ark. 2003, Sochor ve ark. 1991). Diabetik erkeklerde; azalmış fertilitate potansiyeli, testiküler işlev bozukluğu, kötü semen kalitesi, azalmış sperm hareketi ve anormal sperm morfolojisi gibi sorunlar görülmektedir (Bitzer ve Alder 2009, Ziaei-Rad ve ark. 2010). Ayrıca bu erkeklerde bozulmuş Leydig hücre işlevine bağlı olarak serum testosteron seviyelerinde azalma da gözlenir (Amaral ve ark. 2008, Hidalgo-Tamola ve Chitaley 2009).

Diabeti başlatan asıl neden, pankreastan yapılan insülin salınımının azalması ya da tamamen sona ermesidir. Ancak diabetin gelişiminde doğrudan ya da dolaylı olarak pankreas dışındaki faktörlerinde etkisi bulunmaktadır. Nörolojik bozukluklar, sağlıksız beslenme, kalıtsal etmenler, enfeksiyon, karaciğer, böbrek üstü bezleri, tiroid ve hipofizdeki patolojik değişimler bu hastalığın nedenleri arasında yer alır (Yılmaz 1999).

DM; Tip 1 Diabetes Mellitus, Tip 2 Diabetes Mellitus, Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) ve diğer spesifik tipler olmak üzere dört ana başlıkta sınıflandırılmaktadır (Bennet 1991).

1.1.2. Diabetes Mellitusun' un Çeşitleri

1.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 diabet, diabet vakalarının %5-10'unu oluşturur ve insüline bağımlı diabet olarak adlandırılmaktadır. Tip 1 diabet otoimmün aracılıklı pankreas β hücrelerinin yıkımı sonucu oluşur ve insülin yetmezliği ile karakterizedir (Fidanol 2012). Hasarın immün belirteçleri olarak da adacık hücresi antikorları ve insülin otoantikorları ile glutamik asit dehidrogenaz (GAD) otoantikorları saptanabilir (American Diabetes Association 2010). Glomerüler geri emilim sınırı geçildiğinde kanda artan glikozun idrar ile atılımı başlar ve sıvı çıkışı artar. Bu etkisinden dolayı aşırı su içme ve susama meydana gelir. İştah ve yemek yeme normal olmasına rağmen kilo kaybı görülür (Fidanol 2012). Tip 1 diabet ya da insüline bağımlı diabet, hiperglisemiye ve farklı dokularda serbest radikallerin artmasına, buna bağlı olarak da oksidatif strese sebep olmaktadır. Serbest radikallerin yüksek seviyede bulunması hücre organellerinde hasara ve hücre membranında lipid peroksidasyonunun artmasına yol açmaktadır (Agarwal ve ark. 2008, Abeer 2010).

1.1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Erişkin toplumlarda en yaygın görülen metabolizma hastalığıdır. Tip 2 diabetli hastaların %80'inden fazlası obezdir; İnsülin direnci ile obezite arasında mutlak bir ilişki vardır. Orta-ileri yaş hastalığı olarak kabul edilen Tip 2 diabetes mellitus, kırk yaş üstü grupta görüldüğü gibi, yaşam tarzı değişikliklerine bağlı olarak son yıllarda gençler ile birlikte çocuklarda da görülme sıklığı artmaktadır. Günümüzde yaşam tarzının değişmesinden kaynaklanan fiziksel aktivite azlığı, dengesiz ve düzensiz beslenme, stresin artması gibi faktörler tip 2 diabetin ortaya çıkışını hızlandırır. Tip 2 diabet klasik diabet belirtilerini erken dönemde göstermemesi nedeniyle tanısı geç konmaktadır (American Diabetes Association 2010, Olgun ve ark. 2011, Whiting ve ark. 2011).

1.1.3. Streptozotosin

Günümüzde tüm dünyayı etkileyen diabetes mellitus hastalığının anlaşılmasına yönelik deneysel diabet modelleri üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır (Öztürk ve ark. 2002, Khaki ve ark. 2010, Kushwaha ve Jena 2013). Deneysel diabet oluşumunda alloxan ve streptozotosin (STZ) gibi maddeler kullanılmaktadır (American Diabetes Association 2010). Bunlardan özellikle daha yaygın kullanılan STZ, Streptomyces achromogenes kültüründen ilk defa 1960'da elde edilmiştir (Cabadak 2008). STZ'nin Rakieta ve arkadaşları (1963) tarafından köpek ve sıçanlarda diabetin kalıcı olarak oluşturulmasıyla etkisi anlaşılmıştır (Rakieta ve ark. 1963). STZ araştırmalarda β hücrelerine toksik etki yapması nedeni ile diabet tipleri oluşturma amacı ile kullanılan kimyasal bir ajandır. STZ, Tip I ve Tip II diabet modelleri oluşturma amacı için yaygın olarak kullanılır (Szkudelski 2001).

1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

1.2.1. Serbest Radikaller

Oksijen, hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır ve canlılar için hayati öneme sahip olan bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin çoğu oksijene dayanır. Serbest radikaller enerji üretim sürecinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (Mccord 1993, Agrawal ve ark. 2007). Biyolojik sistemlerde, serbest radikaller en çok elektron transferi ile oluşurlar ve atomik veya moleküler yörüngesinde bulunan ve çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal üründür (Altan ve ark. 2006).

Günümüzde yapılan çalışmalar (Altan ve ark. 2006, Agrawal ve ark. 2007) göstermiştir ki; erkek üreme sisteminin primer patolojileri (erkek aksesuar bez enfeksiyonları, anormal spermatozoon yapısı, spermatozoonun epididimiste veya geçiş esnasında uzun süreli kalması), sistemik patolojileri (diabetes mellitus, kanser, enfeksiyon) ve yaşam tarzı faktörlerinin (sigara, radyasyon, çevre kirliliği, ilaçlar) serbest radikallerin yüksek seviyede olmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu durumun sperm kalite ve işlevinde olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Sharma ve Agarwal 1996, Hampl ve ark. 2012).

Bu oksidanlar organizmada mitokondriyal, sitoplazmik ve ekstrasellüler formları içeren süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferin, indirgenmiş glutatyon (GSH), metiyonin, vitamin A,C,E gibi antioksidanlar tarafından yıkılırlar (Aydın ve ark. 2001).

1.2.1.1. Oksidatif Stres

Serbest radikaller hücrelerde proteinlere, DNA' ya ve lipidlere etki göstererek hasar verir. İnsan hastalıkları ve oksidanlar arasındaki bağlantı, antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki dengeye bağlıdır. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için, hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Bunun sonucunda hücre, serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunabilir. Serbest radikaller lehine eğer bu denge bozulursa, yani yapımından daha yavaş nötralize edilirse, hücre içinde serbest radikallerin artması gözlenir. Bu etkileşim kritik moleküllerde ve yeterli şiddette meydana geldiğinde doku hasarına neden olur. Oksidatif stres, serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etki göstermesi olarak tanımlanır (Gomez ve ark. 1996, Aydın ve ark. 2001).

1.2.2. Antioksidanlar

Serbest radikallerin organizmalarda önemli yıkıcı hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Bu hasarın önlenmesi için savunma mekanizmaları bulunmaktadır ve bu mekanizmalar 'antioksidan savunma sistemleri' olarak isimlendirilmektedirler. Bu sistemler, hem intraselüler hem de ekstraselüler yapıdadır. Serbest radikallerin birçoğu antioksidan savunma sisteminden kurtularak etkilerini sürdürebilirler (Sikka ve ark. 1995, Halliwell ve Gutteridge 2015). Antioksidan sistemde enzimatik (Glutatyon peroksidaz / Glutatyon reduktaz: GPX / GRD, Süperoksit-dismutaz: SOD Katalaz: CAT) ve enzimatik olmayan (Hipotaurin, Askorbat, Ürat, Pirüvat, Vitamin E, Taurin) antioksidan yapıları mevcuttur. Bu tür antioksidanlar önleme, durdurma ve tamir etme olmak üzere üç savunma mekanizması içerir (Maldjian ve ark. 2003, Baker ve Aitken 2005).

1.2.2.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim olmayanlar ve enzim olanlar olmak üzere iki sınıftan oluşurlar. Enzim olan endojen antioksidanlar: Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferazlar (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-GPx), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz olarak bilinirken (Silva 2006) enzim olmayan antioksidanlar ise; melatonin, transferrin, seruloplazmin, miyoglobin, ferritin, hemoglobin, bilirubin, sistein, glutatyon, metiyonin, urat, albümin ve laktoferrindir (Şener ve Yeğen 2009).

1.2.2.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen olarak bilinen ve dışarıdan temin edilen antioksidanlar: α -tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), β -karoten, ksantin, folik asit (folat), oksidaz, mannitol, barbitüratlar, albümin, demir, selatörleridir (Halliwell ve Gutteridge 2015).

Antioksidanların etki mekanizması dört ayrı şekilde ifade edilir. Bunlar;

- I. Toplayıcı etki; Antioksidanlar serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme özelliğine sahiptirler. Örnek olarak SOD, GPx ve katalaz enzimleri ve bazı bağlayıcı proteinler verilebilir.
- II. Bastırıcı etki; Antioksidanlar, serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltabilir veya inaktif şekle dönüştürebilirler. Ör; vitaminler, flavanoidler, mannitol, antosiyanidinler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- III. Zincir kırıcı etki; Antioksidanların serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerinin kırılması ve böylelikle fonksiyonlarını engelleyici bir etkisi vardır. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- IV. Onarıcı Etki; Antioksidanların serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarıcı etkisi vardır. DNA tamir enzimleri, methionin sülfoksid redüktaz onarıcı etki gösterir (Akkuş 1995, Şener ve Yeğen 2009).

ANTIÖKSİDANLAR				
ENDOJEN KAYNAKLI ANTIÖKSİDANLAR		EKSOJEN KAYNAKLI ANTIÖKSİDANLAR		
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Vitamin Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Antioksidanlar	Gıdalardaki Antioksidanlar
-Katalaz	*Yağda Çözünen	-Vitamin C	-NADPH Oksidaz	-Sodyum
-Mitokondrial	Radikal Tutucular	- α -tokoferol	İnhibitörleri (adenozin,	benzoat
Sitokrom	- α -tokoferol	- β -karoten,	lokal anestezipler,	-BHT
Oksidaz Sistemi	-Bilirubin	-Folik asit	kalsiyum kanal	-Etoksiquin
-Glukoz 6	-Ubikinol		-Ksantin Oksidaz	-BHA
Fosfat	- β -karoten		İnhibitörleri (allopürinol,	
-Dehidrojenaz	*Suda Çözünen		tungsten, oksipürinol)	
-Glutasyon S	Radikal Tutucuları		blokerleri, non-steroid	
Transferaz	-Melatonin -		antiinflamatuvar ilaçlar)	
-Glutasyon	Askorbik Asit		-Nötrofil Adezyon	
Peroksidaz	-Ürik Asit		İnhibitörleri	
-Süperoksid	-Glutasyon		-Demir Redoks	
Dismutaz	*Metal İyonlarını		döngüsü İnhibitörleri	
	Bağlayan Proteinler		(desferroksamin)	
	-Albumin		-Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	-Ferritin		-Demir Şelatörleri	
	-Transferrin		-Barbitüratlar	
	Haptoglobin			
	Seruloplazmin			

Tablo 1: Kaynaklarına göre antioksidanlar (Cross 2003).

1.2.3. Melatonin

Melatonin çok güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra, serbest radikaller aracılığı ile meydana gelen oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermektedir. Melatonin bu fonksiyonlarına ek olarak organizmada cinsel gelişimin kontrolü, immün yanıtın oluşturulması, yaşlanma, ısı ve uyku düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda da rol almaktadır (Reiter ve ark. 1997).

Melatoninin lipofilik yapıda olması, hücrenin bütün organellerine girebilmesine, hücre çekirdeğine ulaşmasına ve kan-beyin bariyerini geçmesine olanak tanımaktadır. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi, DNA'yı oksidatif hasardan koruması açısından önemlidir (Beyer ve ark. 1998).

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) pinealositlerde triptofandan sentezlenir. Triptofan N-asetiltransferaz (NAT) enzimi ile önce serotonine dönüştürülür ve ardından diğer bir pineal enzim olan hidroksi indol O-metil transferaz aracılığıyla melatonine dönüşür. Bu sentez yolağının düzenlenmesi primer olarak gece saatlerinde gerçekleşmektedir, yani diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır (Borjigin ve ark. 2012, Morris ve ark. 2012). İnsanda birçok davranışsal, biyokimyasal ve fizyolojik değişimlere göre plazmadaki melatonin düzeylerin de 24 saatlik periyod içinde inişler ve çıkışlar gözlenebilmektedir. Gece saat 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi gece yarısından sonra bir ile beş arası doruk değerlere ulaşır ve gündüz saatlerinde ise bu değer düşer (Yıldız ve ark. 2006, Borjigin ve ark. 2012).

1.2.3.1. Melatonin Etki Mekanizması

Melatoninin hücrelere rahatça girebilmesinin sebebi, lipid çözünürlüğünün suya göre yüksek olmasıdır. Budan dolayı melatoninin etkileri sadece membrana yönelik değildir. Aynı zamanda sulu ortamda kısmen çözünmesi intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkı sağlar. Melatoninin, serbest radikaller sonucu oluşan oksidatif strese karşı süpürücü antioksidan etkisi bulunmaktadır. Hidroksil ve peroksil radikalleri için süpürücü etkiye sahip olan melatonin, OH radikalini nötralize etmekte glutatyona göre 5 kat, ROO inaktivasyonun da ise E vitaminine göre 2 kat daha fazla etkiye sahiptir (Pieri ve ark. 1994).

Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive eder ve O_2 radikalini H_2O_2 'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırır. Ayrıca melatonin oksidatif stres esnasında katalaz (CAT) aktivitesindeki azalmayı önler ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (Reiter ve ark. 1995, Reiter ve ark. 2000).

1.2.4. Katalaz (CAT)

Katalaz 1901 yılında Loew tarafından hidrojen peroksidi parçalayan enzim olarak dünyaya tanıtılmıştır. Katalaz sığır karaciğerinden elde edilen bir enzimdir 1 saniye içerisinde hidrojen peroksidi 5.000.000 taneciğe ayırır ve etkisi çok büyüktür

(Çimen ve ark. 2005). Katalaz; H_2O_2 'yi O_2 ve H_2O yıkımlayan bir enzimdir. Hemoprotein olan CAT' ın molekül ağırlığı 248 kDa'dur. Yapısında dört hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır. Hidrojen peroksit oluşum hızının düşük olduğu durumlarda ise peroksidatif etkisi vardır. Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahiptir, aktivitesi için demir gereklidir (Meister ve Anderson 1983).

Katalaz enzimi esas olarak peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitosolde de yoğundur. Aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Katalaz, lipid peroksitleri gibi büyük molekülleri indirgeyememektedir. Enzim bir molekül H_2O_2 'den elektron alarak onu oksitlerken kendisi redüklenir, bir diğer molekül H_2O_2 ' e elektron vererek onu indirgerken kendisi oksitlenerek başlangıçtaki durumuna döner (Karabulut 2001).

1.3. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, regülatör molekül grubudur ve genellikle 6-30 kDa büyüklüğündedir (Van Zoelen 1999). Büyüme faktörleri hücrelerin replikasyon ve farklılaşmasını düzenler. Sistemik dolaşımında bulunurlar, çeşitli hücre sistemleri ve dokularca salınırlar, bu nedenle de hücre metabolizmasının sistemik ve lokal düzenleyicileridir. Büyüme faktörleri dolaşımında serbest olarak ya da spesifik bağlayıcı proteinlere bağlı olarak bulunurlar yada trombosit agregasyonundan sonra salınmak üzere trombosit granüllerinde depolanırlar (Canalis 1992).

Büyüme faktörleri otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalarla hücrel fonksiyonları sağlarlar. Otokrin faktörler salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarını etkiler. Salgılandıkları alanda etkili olan faktörler parakrin yolla etki eder. Endokrin olarak etkileyen faktörler ise hedef hücreye kan yoluyla gider ve diğer hücreleride etkiler. Bir kaç transforme fibroblast, hücrenin kendi içinde hiç salgılanmamış faktörlere intrakrin mekanizma ile yanıt verirler (Fisher ve Delbert 1990, Steenfos 1994).

Hedef hücrenin büyüme faktörü tarafından etkilenmesi reseptörün bulunup bulunmaması bağlıdır. Reseptöre bağlanması sonucunda hücre içerisinde özgün bir cevap ortaya çıkar. Etki genellikle tirozin kinazın uyarılması sonucu sağlanır. Her hücrede farklı büyüme faktörü için, farklı sayıda reseptör bulunur (Fisher ve Delbert 1990, Steenfos 1994).

Büyüme faktörleri; kemotaktik ve hücresele proliferasyonu uyarmasıyla, aynı ve farklı tipteki hücreler arasındaki sinyalizasyonu sağlamasıyla, ekstrasellüler matriks oluşumu ve anjiogenezi kontrol etmesiyle, konsantrasyon sürecini düzenlemesiyle ve doku bütünlüğünü yeniden kurmasıyla iyileşme sürecinde temel bir rol oynarlar (Gope 2002).

Büyüme faktörlerinin embriyo gelişimi ve oosit üzerine etkileri, daha önceki yıllarda ve günümüzde bir çok çalışmaya konu olmuştur. Oosit ve erken embriyo gelişimiyle ilgili olarak üzerinde durulan büyüme faktörleri; büyüme farklılaşma faktörü (GDF-9), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin büyüme faktörü (IGF-I, II), transforme edici büyüme faktörü (TGF- α , β), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), şeklinde sıralanır (Lee ve ark. 2011).

TGF- β ailesinden büyüme faktörleri testis dokusunda da spermatogenez sırasında birçok hormonla birlikte görev alır. Yapılan yeni çalışmalar göstermiştir ki TGF- β ailesinden (Transformers growth factor beta) büyüme faktörleri testis gelişiminde önemli bir rol oynadığı anlaşılmaya başlanmıştır. (Zhao ve ark. 2011).

1.3.1. Büyüme Farklılaşma Faktörü (GDF-9)

GDF 9 son yıllarda üzerinde en çok çalışılan büyüme faktörlerinden biridir ve ilk olarak northern blot analizi ile yetişkin farelerin yumurtalıklarında spesifik olarak tespit edilmiştir (McPherron ve Lee 1993). TGF- β ailesinin (transforming growth factor superfamily) bir üyesidir. TGF- β ailesi, ovaryumdaki folliküler gelişimi, ekstrasellüler sinyal yolları ile düzenler (Martins ve ark. 2008, Peng ve ark. 2010, Abdel-Ghani ve ark. 2016). Fare, sıçan ve insanlarda yapılan çalışmalarda GDF-9'un ovaryumdaki follikülogenez için ihtiyaç duyulan önemli faktörlerden olduğu bildirilmiştir (Dong ve ark. 1996, Pellicer ve ark. 1999). GDF-9'un hücre

çoğalmasında artış ya da azalma olması durumunda tek tabakalı primer foliküller aşamasından, çok tabakalı foliküler gelişim aşamasına geçişte belirgin bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, GDF-9'un in vivo çalışmalarda somatik hücre fonksiyonlarında ihtiyaç duyulan oosit kaynaklı önemli bir faktör olarak gösterilmektedir (Dong ve ark. 1996). Yokluğunda infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Dong ve ark. 1996, Kumar ve ark. 1997, Yan ve ark. 2001).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda (Nicholls ve ark. 2009, Zhao ve ark. 2011, Shah ve ark. 2016) ovaryumda etkisi olan GDF-9' un testis hücrelerinde de etkili olduğu ve gametogenez sırasında sinyal yollarından salgılandığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu in vitro verilerde GDF-9' un spermatogenezisi düzenlediği ileri sürülmektedir ve GDF-9' un sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarında (kan-testis bariyeri) inhibe olduğu ifade edilmiştir (Fitzpatrick ve ark. 1998, Aaltonen ve ark. 1999, Pernetier ve ark. 2004). Ayrıca son zamanlardaki veriler GDF-9'un testiste potansiyel olarak spermatogenezde özellikle spermatidlerin kuyruk oluşumu ve iletimini düzenlediği yönündedir. GDF-9'un ağırlıklı olarak primer ve sekonder spermatositler ile spermatidlerin sitoplazmasında ve lokalize olduğu ifade edilmiştir. GDF-9 testis germ hücresi spesifik faktördür ve GDF-9 parakrin salgılama ile sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarını ve otokrin salgılama ile germ hücrelerini düzenlemektedir. GDF-9 başlıca germ, sertoli ve Leydig hücrelerinin sitoplazmasında immunolokalizasyon gösterir fakat germ hücrelerindeki ekspresyonun sertoli hücrelerinden daha zayıf olduğu bildirilmiştir (Nicholls ve ark. 2009, Zhao ve ark. 2011). Guo ve ark (2013) göre otokrin yolla primer spermatositlerden spermatidlerin oluşması için seminifer tubüllerde GDF-9' un gerekli olduğu bildirilmiştir (Guo ve ark. 2013).

1.4. Erkek Genital Sistemi

Erkek üreme sistemi; spermatozoon ve erkek cinsiyet hücrelerini üreten testisler, testis içi ve dışı genital kanallar (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimidis, duktus deferens, duktus ejakulatoryusu), yardımcı bezler (seminal vezikül, prostat, bulbo üretral) ve penisten oluşur (Aytekin 2016).

1.4.1. Testis

Testisler seksüel olgunlaşmayı, üreme fonksiyonlarını ve embriyonik gelişimi etkileyen ekzokrin (sperma hücreleri, spermatozoonlar) ve endokrin (testosteron) fonksiyonlara sahiptir (Alaçam 1999, Aytekin 2016).

Testisler, skrotum denilen torba içinde funikulus spermatikus ile asılı duran bir çift organdır. Skrotumun testisin ısını, intra abdominal ısının altında tutmak gibi önemli görevleri vardır (Tanyolaç 1999). Testisler içine yerleştiği skrotumda bulunan oval biçimli organlardır. Sıçanlarda testis ağırlığı vücut ağırlığının %1'ini oluştururken, insanda bir testis 15 gr ağırlığındadır (Aytekin 2016).

Testislerin etrafını saran kapsül içten dışa doğru üç tabakadan meydana gelir. Bunlar tunika vasküloza, tunika albuginea ve tunika vaginalis olarak adlandırılır (Aytekin 2016). Tunika vaginalis; bu tabaka içte visseral ve dışta pariyetal yapraklara ayrılır ve testisin tunika albuginea kısmını örter (Junqueira ve Carneiro 2006, Aytekin 2016). Tunika albuginea; Kapsülün en kalın ve belirgin olan fibroelastik bağ dokusu tabakasıdır. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar bu tabaka içinde seyrederek. Tunika vasküloza; Skrotumu saran kapsülün en iç tabakasına tunika vasküloza denir. Bu tabaka gevşek bağ dokusuyla sarılı damardan zengindir. Her testis lobülü sinirleri, kan damarlarını ve interstisyel hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarılı seminifer tubülden oluşur (Aytekin 2016).

1.4.1.1. Seminifer Tubül

Seminifer tubüller spermlerin üretildiği, kıvrımlı seyreden tubüllerdir. Her testiste 250-1000 adet tubül bulunur. Lobüllerin apeksinde düz seyreden tubüller tubuli rekti olarak isimlendirilirler. Düz tubüller mediastinumda bulunan

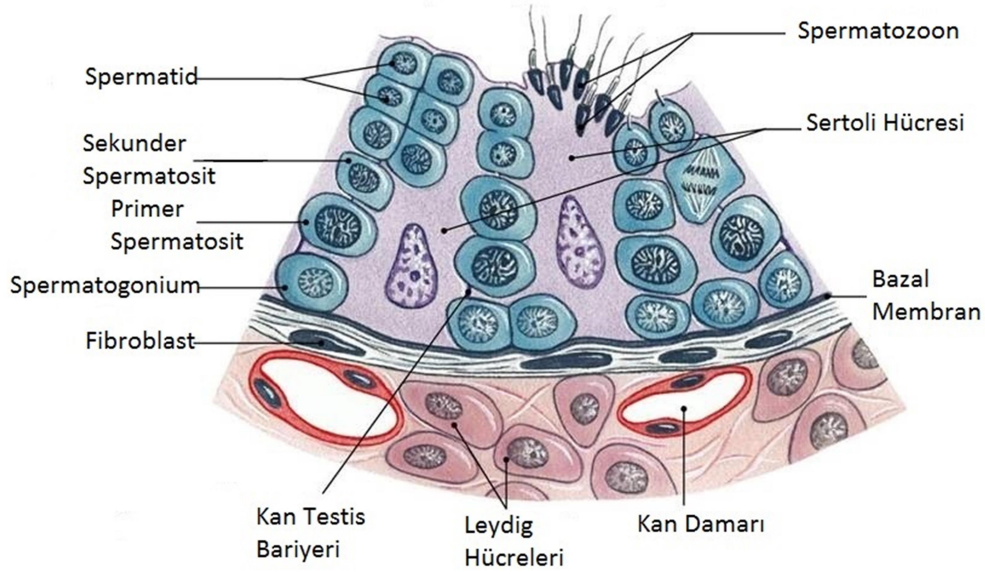
anastomozlaşan kanallar olan rete testis ile devamlılık gösterir. Rete testis, epididimisin ile duktuli efferentes baş kısmına bağlanmıştır. Seminifer epitelde yer alan hücre grubundan biri germ hücreleri olan spermatogenetik hücrelerdir. Diğer hücreler ise onları besleyen ve germ hücrelerine destek olan sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri prizmatik hücrelerdir ve bazal membrandan tubül lümenine kadar uzanır. Spermatogenetik hücreler ise ard arda ve birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamasında olan hücrelerdir. Bunlardan spermatogonyumlar bazal membrana en yakın olanlardır. Spermatidler ise lümene en yakın olan ve daha olgun hücrelerdir. Spermiyumlar lümeninde izlenir. Epitel altında yer alan tunika propriya, fibroblast içermeyen tipik birçok tabakalı bağ dokusudur. Bu tabaka insanda seminifer epiteli kuşatan ince bazal membran altında 3-5 sıra miyoid hücre ve kollajen lif tabakası içerir. Bu dokuya peritübüler doku da denir. Kemiricilerde bu tabaka tek sıra yassı miyoid hücre tabakası şeklindedir (Aytekin 2016).

1.4.1.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücrelerinin, spermatogenetik hücrelerden farklı olarak bölünme yetenekleri yoktur, soluk boyanan sitoplazmalarıyla ışık mikroskopik olarak sınırlarının seçilmesi zordur (Denek 2010). Sertoli hücrelerinin lateral uzantıları ile oluşturulan bölmelere spermatogenetik hücreler yerleşmişlerdir. Sertoli hücrelerinin birbirleri ile bağlanması ile oluşan epitelyal bölmelerin bazal bölümünde spermatogonyumlar ve erken dönem primer spermatositler, luminal bölümünde ise daha olgun spermatositler ve spermatidler bulunur. Sertoli hücrelerinin birçok görevi vardır. Bunlar arasında; Gelişmekte olan spermleri destekleme, koruma ve besleme, gelişimlerini tamamlayamamış spermatogenetik hücrelerin fagosite edilmesi, sperm transportu için kullanılan seminal plazmanın salgılanması sayılabilir (Aytekin 2016). Yine bunlara ilaveten sertoli hücreleri spermatogenetik hücrelerin farklılaşım olgunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein, FSH salınımını baskılayan inhibin, plazminojen aktivatör ve transferin sentezinin yanı sıra anti-müllerian hormon salgırlar (Kierszenbaum 2006). Ayrıca, sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksleri spermatogenetik hücreleri barındıran epitelyal alanlar oluşturmalarının yanı sıra kan-testis bariyeri olarak isimlendirilen önemli bir bariyeri de oluştururlar (Aytekin 2016).

1.4.1.4. Spermatogenez

Yeni bir canlının oluşması haploid sayıda kromozoma sahip erkek ve dişi germ hücrelerinin birleşerek diploid sayıda kromozoma sahip olan zigot oluşumu ile başlar. Pubertadan sonra olgun erkek germ hücrelerinin oluşması spermatogenez olarak bilinir ve 4 evrede gerçekleşir. Bu evreler; çoğalma, büyüme, olgunlaşma, başkalaşım dönemidir (MacLean ve Wilkinson 2005). Çoğalma döneminde spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle sayıca artarlar. Bu dönem goniyogenezis veya spermatositogenez olarak bilinir. Büyüme döneminde spermatogonyumlar primer spermatosit bölünürler (Tanyolaç 1999, MacLean ve Wilkinson 2005). Primer spermatositlerden birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositler oluşur. Olgunlaşma dönemi spermatositlerin ard arda iki bölünme geçirerek kromozom sayıları ve DNA miktarlarını yarıya düşürerek spermatidleri oluşturduğu evredir. Primer spermatosit birinci mayoz bölünmesi ile iki adet sekonder spermatosite bölünür. Bu bölünme ile primer spermatositin diploid kromozom sayısı haploide inmiş olur. Sekonder spermatositler primer spermatositlere oranla çok daha küçük hücrelerdir. Sekonder spermatositlerden ikinci mayoz bölünme sonunda spermatidler oluşmaktadır. Bu spermatidler DNA içeriğine ve haploid kromozoma sahiptirler. Spermiyogenez, spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara (sperm) dönüştüğü başkalaşım dönemidir. Spermatidler yuvarlak veya poligonal şekilli, yoğun çekirdekli. Spermatidlerin başkalaşım döneminde çekirdekleri küçülür, yoğunlaşır ve hücreler kuyruk oluşturarak spermatozoonlara dönüşür. Spermiyogenezde, spermatogenetik hücreler gibi seminifer tubüllerde yer alan sertoli hücreleride önemli rol oynarlar. Değişim süresince spermatidler sertoli hücre membranlarına bağlı kalırlar (MacLean ve Wilkinson 2005, Aytakin 2016).



Şekil 1: Tubulus Seminiferus Kontortus (banks kitabından uyarlanmıştır.) (Banks 1986)

1.4.1.5. İnterstisyel Doku

İnterstisyel doku; seminifer tubüllerin arasında yer alan sinirlerden, lenf ve kan damarlarından ve ayrıca gevşek bağ dokusundan oluşur. Gevşek bağ doku içerisinde tek tek ya da kümeler halinde Leydig hücreleri bulunur. Leydig hücreleri steroid sentezleyen hücre özelliğini gösterir ve sitoplazmalarının en tipik özelliği çok sayıda lipid damlasının bulunmasıdır (Aytekin 2016). Leydig hücreleri, pubertadan sonra, siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimini etkinleştirerek lüteinleştirici hormon (LH)' u uyarır ve ardından 5α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron'a dönüştürülen, testosteronu üretir. Leydig hücreleri tarafından üretilen bu testosteron spermatogenezin ve diğer erkeklik özelliklerin oluşumu ve sürekliliği için önemlidir (Kierszenbaum 2006).

1.5. Diabetes Mellitus, Erkek Genital Sistemi, Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri

DM, günümüzde bilindiği üzere dünyada hızlıca yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır (Pitkanen ve ark. 1992). Diabette oksidatif stres pek çok mekanizmaya bağlı olarak artabilmektedir, ancak bu mekanizmaların kesin katkısı tam olarak kanıtlanmış değildir (Atalay ve Laaksonen 2002). Oksidatif stres;

diabet ve diabetin komplikasyonları başta olmak üzere; infertilite, üriner sistem hastalıkları, miyokardiyal enfarktüs, kanser, katarakt, solunum, sinir ile stres ve yaşlanma gibi birçok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar (Pitkanen ve ark. 1992, Ak ve ark. 1994, Atalay ve Laaksonen 2002). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diabet oluşturulan sıçanlarda ve diabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Pitkanen ve ark. 1992, Ak ve ark. 1994, Atalay ve Laaksonen 2002).

Diabetin beyin, pankreas, testis gibi farklı organlarda birçok yapısal ve fonksiyonel etkileri vardır. Diabet insanlarda ve hayvanlarda erkek üreme fonksiyonlarını bozabilir (Şişman ve ark. 2014). Diabetin etkisi ile testis dokularında; seminifer tubüllerde, tunika albuginea, interstisyel bağ dokusu içinde ve Leydig hücrelerinde histolojik değişikliklerin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Diabetin gonadal fonksiyonlara etki ederek, testosteron düzeyini düşürdüğü, yetersiz spermatogenez ve testiküler disfonksiyon oluşturduğu anlaşılmıştır (Öztürk ve ark. 2002). Cai ve ark (2000) tarafından sıçanlarda diabet oluşumu sonucu, testiküler germ hücrelerinde apoptoziste artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Cai ve ark. 2000). Bunun yanı sıra Ficher ve ark (1984) ile Steger ve Kienast (1990) tarafından yapılan çalışmalarda Diabetes Mellitus'un canlılarda anormal sperm yapımına ve üremedeki engellere sebep olduğu, diabetik erkeklerde infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Ficher ve ark. 1984, Steger ve Kienast 1990). Atalay ve ark (2003) tarafından STZ intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturdukları diabet çalışmalarında, fertilitte, testiküler ağırlığın, testiküler sperm sayısı, sperm hareketliliği, proliferasyon yeteneğinin belirgin olarak azaldığı, STZ uygulanmasıyla testiste germ hücre sayısında azalma, seminifer tubül duvarında kalınlaşma, Leydig hücrelerinin sayısında ve fonksiyonunda azalmanın gözlemlendiği bildirilmiştir (Altay ve ark. 2003).

Diabetin etkisi sonucu, vücut ve reproduktif organ ağırlıklarında azalma gerçekleşir. Diabetik canlılarda, testislerin epididimislerinde sperm sayısında azalmaya, testiküler işlev bozukluğuna, kötü semen kalitesine, azalmış sperm hareketi ve anormal sperm morfolojisi gibi sorunlarla karşılaşıldığı ifade edilmiştir (Bitzer ve Alder 2009, Ricci ve ark. 2009, Ziaei-Rad ve ark. 2010).

Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, ilk olarak 1943 yılında aerobik şartlarda inkübe edilen insan spermatozoonlarının hareketliliği üzerine çalışan İskoç Androlog John MacLeod'un ortama (besiyerine) CAT eklenmesi ile, sperm hareketliliğinin arttığını göstermesi ile başlamıştır (MacLeod 1943). Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlığı bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanların etkili olmadığı, oksidatif hasarı azaltabilmenin sadece dışardan alınacak antioksidanlarla mümkün olduğu (Örn: Melatonin, Vitamin E, C) ve spermin kalitesini yapılan antioksidan tedavi ile artabileceği ifade edilmiştir. Bu tedaviyle fertilizasyon oranlarının artması sonucu lipid peroksidasyon potansiyelinin azaldığı görülmüştür (El-Missiry ve Shalaby 2000, Orozco ve ark. 2003).

Testislerin; steroid hormon ve sperm üretimini desteklemek amacı ile oksidatif strese karşı korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı alt üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir (Ikeda ve ark. 1999). Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimini göstermektedir. Testisteki zayıf vaskülarizasyona bağlı olarak oksijen miktarının düşük olması sonucu bu oksijene olan ihtiyaç artmaktadır. Ayrıca fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle testis oksidatif strese karşı hassas hale gelmektedir. Hem spermatogenez hem de Leydig hücrelerindeki steroidogenez, oksidatif stresle hasar görebildiği ve bu dokudaki düşük oksijen miktarı nedeniyle, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmalar önem kazanmaktadır (Tekcan 2009).

Testis bu korunmayı sağlamak için; çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir. Bunların sonucunda; erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerinin kaybı ve testiküler SOD ile CAT'ın baskılanması görülmektedir (Karabaş Kuru 2009).

Fatani ve ark. (2015) diabetli sıçanlarda oksidatif strese karşı etkili olacağını düşündükleri antioksidan etkili besin takviyesi olan lutein kullanarak testis dokusunda antioksidan etkisini incelemiştir. Diabete karşı lutein takviyesinin antioksidan etkisine bakmak için katalaz (CAT) ve TNF- α ile IL-8 sitokinlerin aktiviteleri ölçerek, histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir. Testis dokusunda diabetli grubun kontrol grubunu göre testosteron seviyesinin azaldığını, TNF- α ile IL-8 sitokinlerin düzeylerinin diabetli testiste arttığını, CAT enziminin aktivitesinin diabetli grupta belirgin olarak azaldığını bildirmişlerdir. Ancak lutein uygulaması ile TNF- α ile IL-8 sitokinlerin düzeyi azalmış, antioksidanların düzeyi ise artmıştır. Histopatolojik olarak testis dokusunda kontrol grubuna göre diabetli testis dokusunda seminifer tubüllerde uzama ve tubül bazal membranında kalınlaşma gözlemlendiği, spermatogoniumlarda ve interstitial alanda kan damarlarında ve Leydig hücrelerinde dejenerasyon gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Fatani ve ark. 2015).

Melatonin, hücre membranı ve çekirdeğinde serbest radikallere karşı koyarak çeşitli organların fonksiyonlarını düzenlediği, doku rejenerasyonu ve hücre mitotik aktivite üzerine hızlandırıcı etkisi olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (Beyer ve ark. 1998, Ha ve ark. 1999, Yüzüak 2014). Melatonin insanlarda büyüme hormonu ve kortizol salınımını artırarak kemik oluşumunda etkili olduğu anlaşılmıştır. Melatonin, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2)'nü uyararak osteoblastların çoğalmasını sağladığı bildirilmiştir (Takechi ve ark. 2008).

Melatonin kan beyin bariyeri, kan-testis ve plasentadan rahatlıkla geçebilir (Menendez-Pelaez ve ark. 1993, El-Sokkary ve ark. 1999). Bu farklılıktan dolayı Vitamin E'nin beyin oksidatif strese karşı koruması melatonine göre sınırlıdır. Diabette oksidatif stresin artması testis difonksiyonuna da sebep olduğu ve 5 gün 10 mg/kg melatonin uygulaması ile diabetik ratlarda testiküler hasarı azaltmada faydalı olduğu (Guneli ve ark. 2008) ve diabetik canlılarda vücut ağırlığında ve testosteron seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Roy ve ark. 2013).

Yalçınkaya ve ark. (2009), radyasyon hasarının testis ve böbreklerdeki malonyldialdehit düzeyi (MDA) üzerine etkisi ve melatonin ile önlenmesini araştırmak amacıyla melatonin 5 gün süre ile uygulamışlardır ve çalışmada melatoninin olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Yalçınkaya ve ark. 2009).

Antioksidanlar serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturarak serbest radikallere uygun elektronun bağlanmasını sağlayarak stabil yapı oluşumunu sağlar. Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal fonksiyonlarının yerine getirmelerinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengenin korunması büyük önem taşımaktadır (Akkuş 1995). Antioksidanlarla yapılan çalışmalar sonucunda, antioksidanların, büyüme faktörleriyle ortak fonksiyona sahip olabileceği ve aynı zamanda büyüme faktörleri üzerine etkileri olduğu açıklanmıştır (Takechi ve ark. 2008).

Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. TGF- β ailesi, hedef hücrenin uyarıya verdiği yanıtın çeşidine bağlı etkileri olan çok fonksiyonlu agonistlerdir (Massagué 2000, Shi ve Massagué 2003). GDF-9, TGF- β süper ailesine ait olan kemik morfogenetik proteinlerin (BMPs) bir üyesidir. BMPs çeşitli hücre tiplerinde invazyon, farklılaşma, apoptozis, hücre büyümesi ve önemli hücresel süreçlerin çeşitliliğini düzenleyebilen çok fonksiyonlu büyüme faktörleridir (Chen ve ark. 2004, Du ve ark. 2012). Testislerde yüksek seviyede ekspre edilebilen GDF-9 ve BMP15'in özellikle testis fonksiyonlarını düzenleyebilen büyüme faktörleri olabilecekleri düşünülmektedir (Fitzpatrick ve ark. 1998, Aaltonen ve ark. 1999).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda (Fitzpatrick ve ark. 1998, Zhao ve ark. 2011), ovaryumda etkili olan GDF-9'un testis dokusunda da spermatogenez için gerekli olduğu anlaşılmıştır. GDF-9'un Leydig hücrelerinde, sertoli hücrelerinde kan testis bariyerinde, primer ve sekonder spermatosidlerde ve spermatidlerde lokalize olduğu bildirilmiştir. Sertoli hücrelerinin sadece germ hücrelerine destek olma ve kan testis bariyerini oluşturma gibi temel fonksiyonlarının yanı sıra sayısız madde salgılayarak ya da üzerindeki reseptör aracılığı ile pek çok hormon ve moleküler yapılarla etkileşim gösterdiği anlaşılmıştır (Vitt ve ark. 2000, Shah ve ark. 2016). Ayrıca spermatogenez oluşum sürecinde FSH, reseptörler aracılığı ile başkalaşımda etkilidir. FSH ile birlikte tiroid hormonu, büyüme hormonu (GH), insülin-benzeri

büyüme faktörü-I (ILGF-1), aktivin ve diğer büyüme faktörleride bu süreçte yer alır (Nicholls ve ark. 2009, Zhao ve ark. 2011).

Diabetes Mellitus' un testis dokusu üzerindeki olumsuz etkileri, melatoninin ise serbest radikalleri etkisiz hale getirerek dokuda hücrel iyileşme sağlaması, endojen antioksidanlardan olan CAT'ın diabette nasıl etkilendiği ve bunla bağlantılı olarak büyüme faktörü (GDF-9) etkilerini inceleme amaçlanmıştır.



2. MATERYAL ve METOD

2.1.MATERYAL

2.1.1.Deney Hayvanı Materyali

Yapılan çalışma Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ile Kafkas Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan deney hayvanları Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğünden temin edildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları için KAÜ-HADYEK/2014-009 kodlu Etik kurulu onayı alındı. Ortalama 10-12 haftalık, 40 adet erkek *Sprague-Dawley* ırkı rat, Erzurum Bayramoğlu Yem Fabrikası A.Ş.'den temin edilen standart rat yemi ve musluk suyu ile ad libitum beslendi. 1 hafta adaptasyon sürecinden sonra, ratlar 4 gruba ayrılarak nem oranının ortalama $\%50 \pm 5$ olduğu özel bir ortamda 22 ± 2 °C oda sıcaklığında, 12 saat karanlık, 12 saat ışık ortamda standart kafeslerde barındırıldı.

Gruplara göre deneysel uygulamalar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Deney Grupları	Denek Sayısı	Deneysel Uygulamalar
Kontrol Grubu	10	İ.p. enjeksiyon ile pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tanponu enjekte edildi.
Diabet Grubu	10	İ.p. enjeksiyon ile pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tanponu içinde eritilen STZ 50 mg/kg olarak tek doz uygulandı.
Melatonin Grubu	10	Etanolde çözdürülüp serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozunda melatonin i.p. yolla 2 hafta boyunca hergün enjekte edildi.
Diabet + Melatonin Grubu	10	İ.p. enjeksiyon ile STZ uygulamasından sonra, diabet oluşumunu takiben etanolde çözdürülüp serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozunda melatonin i.p. olarak 2 hafta boyunca hergün enjekte edildi.

Tablo 2: Deney grupları ve yapılan uygulamalar (Guneli ve ark. 2008, Aktaş ve ark. 2011, Koral Taşçı ve Gülmez 2014).

2.2.METOD

2.2.1. Streptozotosin ile Diabet Oluşturulması

Çalışmada deney grubuna deneysel olarak diabet oluşturmak için kullanılan streptozotosin (STZ) (Sigma S0130-100 MG), deney süresine kadar -20 °C’de soğuk zincir şartlarına dikkat edilerek muhafaza edildi

Deney grubunda diabet ve melatonin uygulanan diabet grubuna, 8 saatlik açlık sonrası pH 4,5 deki 0,1 M sitrat tanponu içinde eritilen STZ 50 mg/kg dozunda intraperitoneal (ip) olarak tek doz enjekte edilmiştir. Denekler enjeksiyon uygulamasından sonra standart rat yemi ve içme suyu ile beslendi. Diabet ve diabet+melatonin grubuna STZ uygulamasından 72 saat sonra 8 saatlik açlık sonrası kan-glukoz düzeylerine kuyruk veninden alınan kan örneğiyle glukometre (Accu-Chek- Go, Roche) ile bakılarak kan glikoz değerleri 200 mg/dl ve üzeri olan hayvanlar diabetik olarak kabul edildi (Kanitkar ve Bhonde 2004).

2.2.2. Melatonin Uygulaması

Deney grubuna uygulanan melatonin (Sigma-M5250) soğuk zincir şartlarına dikkat edilerek deney süresine kadar -20 °C’de soğuk zincir şartlarına dikkat edilerek muhafaza edildi.

Çalışmada STZ uygulanmasından 72 saat sonra, yani diabet oluşumundan hemen sonra STZ’ li diabetli gruptaki ratlara ve sadece melatonin uygulanacak gruptaki ratlara, etanolde çözdürölüp serum fizyolojikle ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg (Koral Taşçı ve Gülmez 2014) dozdaki melatonin 2 hafta boyunca intraperitoneal (i.p.) yol ile günlük olarak enjekte edildi.

Kontrol grubuna ise İ.p. enjeksiyon ile pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tanponu enjekte edildi.

2.2.3. Canlı Ağırlık Ölçümü

Deneysel çalışmada kullanılan bütün ratların canlı ağırlıkları deneye ilk başlangıç zamanı ‘0’ kabul edilip, 8 saat açlık sonrası sabah erken saatlerde ölçüm yapıldı diğer günlerde ise STZ oluşumundan 8 saat açlık sonrası 3. ve 15. günlerde hassas dijital terazi (Precisa-XB220A) ile tartıldı

2.2.3. Kan- Glikoz Değerlerinin Ölçümü

Deneyssel çalışmaya ilk başlangıç zamanı '0' kabul edilip, 8 saat açlık sonrası kan-glukoz düzeylerine glukometre ile kuyruk veninden alınan kan örneğinde bakıldı. Diğer 3. ve 15. günlerde ise STZ uygulamasından 8 saat açlık sonrası kan-glukoz düzeylerine alınan kan örneğinde glukometre ile ölçüldü. Diabetin teğit edilmesinde kan glikoz değerleri 200 mg/dl üzeri olanlar kabul edildi.

2.2.4. Testis Örneklerinin Alınması

Deney süresi sonunda vücut ağırlıkları ve kan glikoz değeri ölçülerek ratlara eter anestezisi altında, servikal dislokasyonla ötenazi yapıldı ve testis dokuları alındı.

2.2.5. Histolojik İncelemeler

Çalışmada ratlardan alınan testis doku örnekleri % 10' luk formaldehit ve bouin solüsyonlarında tespit edildi. Testis dokuları dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafinde bloklandı. Hazırlanan parafin bloklarından 5-6 mikrometre (μm) kalınlığında krom alüm jelatin ile kaplanmış lamlara seri kesitler alındı. Testislerin histolojik olarak yapısını incelemek için alınan kesitlere Crossmanın üçlü boyama tekniği (Triple Boyama), Hematoksilen&Eosin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları uygulandı (Luna 1968).

Çalışmada tüm gruptaki ratların testis dokusu preparatları ışık mikroskopunda (Olympus Bx51, Japan) değerlendirilerek, gerekli görülen alanlar fotoğraflandırıldı. Preparatlarda, seminifer tubül çapı değerlendirmelerinde her bir rat testis dokusu için yüz (100) adet seminifer tubülün çapı oküler mikrometre ile ölçüldü. Elde edilen sonuçların istatistiki değerlendirmeleri yapıldı.

2.2.6. İmmunohistokimyasal İncelemeler

GDF-9 ve CAT'ın testis dokusundaki immunohistokimyasal dağılımını incelemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği (Hsu ve ark. 1981) uygulandı. Krom alüm jelatin ile kaplanmış lamlara, parafin bloklarından 5-6 μm kalınlığında seri kesitler alındı. GDF-9 ve CAT' varlığını belirlemek için, alınan kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra fosfat buffered 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 15 dk. inkube edildi. PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk.) antijenleri açığa çıkarmak için 10 dk. 600 devirde mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonun içinde maksimum sıcaklıkta ısı uygulandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk.) spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla Ultra V Blok serumda (% 10) inkube edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitlerden CAT immunoreaktivitesine bakılacak kesitler oda sıcaklığında 1 saat süreyle anti-CAT' da (Abcam: ab1877) (1:2000) inkube edildi. Anti-GDF-9 (Abcam: ab93892) (1:80) immunoreaktivitesine bakılacak kesitler ise 1 gece süreyle +4°C' de inkubasyonun ardından yine PBS' de yıkandıktan (3x5 dk.) sonra kesitlere primer antikorun üretildiği türe karşı olan biotinlenmiş sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Rabbit (Lab. Vision, 510.991.2800)) ilave edilerek 30dk oda ısısında bekletildi. Fosfat buffer salinde yıkandıktan (3x5 dk.) sonra kesitlere streptavidin horseradish peroksidaz ilave edilip oda ısısında 30 dk. süre ile bekletildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan (3x5 dk) sonra kromojen uygulaması için Diaminobenzidin-hidrojen-peroksidaz (DAB-H₂O₂) tekniği (Shu ve ark. 1988) kullanıldı. Çekirdek boyaması için hematoksilin yapıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus Bx51, Japan) incelendikten sonra fotoğraflar çekildi. Hücrelerdeki GDF-9 ve CAT immunoreaktivitesi, reaksiyonun boyanma şiddetine göre, birbiriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Derecelendirmede kullanılan semboller Tablo 3' de gösterilmiştir.

Dokudaki Reaksiyon Yoğunluğu	Semboller
Çok yoğun	+3
Orta derece yoğun	+2
Az yoğun	+1
Reaksiyon yok	+0

Tablo 3: Dokulardaki GDF-9 ve CAT immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi.

Dokulardaki GDF-9 ve CAT immunoreaktivitelerinin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacıyla alınan kesitlere primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) bütün işlemler aynı olmak kaydıyla diğer işlemler aynen uygulandı.

2.2.7.İstatistiksel Analiz

İstatistik analiz için SPSS programının 16.0 versiyonu kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların istatistiki kontrolünde one-way ANOVA testi ve Duncan testi kullanılmıştır (SPSS 2007).



3.BULGULAR

Çalışmamızda ratların canlı ağırlıkları, testis ağırlıkları, tubulus seminiferus kontortus çapları ve kan- glikoz değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmesinin yanı sıra testis dokusunun histolojik ve immunohistokimyasal bulgularıda değerlendirilmiştir.

3.1.Canlı Ağırlık Bulguları

Canlı ağırlık değerlendirmeleri 0., 3. ve 15. günlerde yapılmıştır. Grupların kendi içerisinde ve gruplar arasında canlı ağırlıkları aşağıdaki tablolarda verilmiştir. (Tablo 4,5,6,7,8).

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P değeri
0.gün	10	204,44±2,51	0,198
3.gün	10	208,31±2,61	
15.gün	10	211,27±2,70	

Tablo 4: Kontrol grubu içinde günlere göre canlı ağırlıkların karşılaştırılması (P < 0,05).

Kontrol grubu ortalama canlı ağırlıklarının grubun kendi içerisinde değerlendirilmesinde günlere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadı (P< 0,05).

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P değeri
0.gün	10	206,34±4,77 ^a	0,003
3.gün	10	195,19±2,82 ^{a,b}	
15.gün	10	185,22±4,08 ^b	

Tablo 5: Diabet grubu içinde günlere göre canlı ağırlıkların karşılaştırılması (P < 0,05).). a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

Diabet grubunun kendi içerisinde ortalama canlı ağırlık yönünden günlere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu (P< 0,05). Diabet grubunun 15. gününde diğer günlere göre canlı ağırlıklarında azalma gözlenmiştir.

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P değeri
0.gün	10	203,41±4,07	0,470
3.gün	10	205,67±1,68	
15.gün	10	208,37±2,08	

Tablo 6: Melatonin grubu içinde günlere göre canlı ağırlıkların karşılaştırılması P < 0,05.

Melatonin grubunun kendi içerisinde günlere göre ortalama canlı ağırlıklarının değerlendirilmesinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi (P< 0,05).

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	P değeri
0.gün	10	204,50±2,71 ^a	0,001
3.gün	10	200,04±1,83 ^a	
15.gün	10	190,16±2,40 ^b	

Tablo 7: Diabet + Melatonin grubu içinde günlere göre canlı ağırlıkların karşılaştırılması (P < 0,05). a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

Diabet+Melatonin grubu kendi içerisinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkları yönü ile yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark bulunduğu görüldü (P< 0,05). Diabet+melatonin grubunda canlı ağırlığının 15. günde diğer günlere göre azaldığı gözlenmiştir.

	Kontrol	Diabet	Melatonin	Diabet + Melatonin	P
0. Gün	204,44±2,51	206,34±4,77	203,41±4,07	204,50±2,71	0.953
3. Gün	208,31±2,61 ^a	195,19±2,82 ^c	205,67±1,68 ^{a,b}	200,04±1,83 ^{b,c}	0.001
15. Gün	211,27±2,70 ^a	185,22±4,08 ^b	208,37±2,08 ^a	190,16±2,40 ^b	0.00

Tablo 8: Tüm gruplar arası canlı ağırlık karşılaştırılması (P<0.05). a,b,c: Aynı satırda ve farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir (P<0.05).

Tüm gruplara ait farklı günlerdeki canlı ağırlıklarının değerlendirilmesinde 0. günde kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin grupları arasında canlı ağırlık yönü ile istatistiksel düzeyde bir fark olmadığı gözlemlendi (**Tablo 8**). Ancak 3. gün ve 15. günde ortalama canlı ağırlık yönü ile yapılan istatistiksel düzeyde fark olduğu belirlendi. 3. günde kontrol grubunda canlı ağırlığının diğer 3 gruba göre yüksek olduğu, melatonin ve diabet+melatonin gruplarının canlı ağırlığının kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) düşük olduğu, diabet grubunda ise canlı ağırlığın diğer üç gruba göre istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) en düşük olduğu gözlemlendi. 15. günde ise kontrol ve melatonin grubunun canlı ağırlıklarında istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) fark olmadığı ve diğer gruplara göre istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) yüksek olduğu, diabet ve diabet+melatonin grubunda ise canlı ağırlıkların istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) fark olmadığı ve diğer iki gruba göre düşük olduğu belirlendi.

3.2. Testis Ağırlık Bulguları

Tüm gruplara ait testis ağırlığı yönü ile yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arası istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) anlamlı bir fark gözlemlendi (**Tablo 9**). Kontrol grubunda testis ağırlığının diğer gruplara göre istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) yüksek olduğu, melatonin ve diabet+melatonin grubunun testis ağırlığının istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) benzer olduğu ve kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) düşük olduğu, diabet grubunun testis ağırlığının ise diğer üç grubun testis ağırlığına göre istatistiksel düzeyde ($P < 0,05$) düşük olduğu belirlendi.

Grup	n	Testis Ağırlığı (kg)	P değeri
Kontrol	10	22,73±0,84 ^a	0.047
Diabet	10	17,89±1,86 ^b	
Melatonin	10	21,47±0,82 ^{a,b}	
Diabet+Melatonin	10	19,84±1,06 ^{a,b}	

Tablo 9: Testis ağırlıklarının tüm gruplar içerisinde karşılaştırılması. ($P < 0,05$). a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir ($P < 0,05$).

3.3. Tubulus Seminiferus Kontortus ap Bulguları

Testis dokusu kesitlerinde tubulus seminiferus kontortus çap değeri yönünden kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin grupları arasında istatistiksel düzeyde ($P<0,05$) anlamlı bir fark gözlendi (**Tablo 10**). Kontrol ve melatonin grubun da tubül çapında istatistiksel ($P<0,05$) düzeyde benzer olduğu, diabet+melatonin grubunun diabet grubuna göre artış gözlenirken, diabet grubunda ise istatistiksel ($P<0,05$) düzeyde diğer gruplara göre azalma gözlenmiştir.

Grup	n	Tubulus seminiferus kontortus çap değeri (μm)	P
Kontrol	500	224.20 \pm 1.40 ^a	0.000
Diabet	500	203.68 \pm 1.52 ^c	
Melatonin	500	223.47 \pm 1.23 ^a	
Diabet+Melatonin	500	209.33 \pm 1.24 ^b	

Tablo 10: Gruplar arasında tubulus seminiferus kontortus çap değerleri karşılaştırılması. ($P<0,05$). a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiki olarak önemlidir ($P<0,05$).

3.4. Kan- Glikoz Değeri

Yapılan çalışmada tüm grupların kan-glikoz değeri uygulama başlangıcından itibaren 0., 3. ve 15. günlerde ölçüldü. 0. günde kan-glikoz yönü ile yapılan değerlendirmede gruplar arası istatistiksel düzeyde ($P<0,05$) anlamlı bir fark olmadığı, ancak 3. ve 15. günlerde ise diabet ve diabet+melatonin gruplarında kan-glikoz düzeyinin kontrol ve melatonin uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu bununda istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu ($P<0,05$) gözlendi. Kan-glikoz düzeyinin en yüksek diabet grubunda olduğu, diabet+melatonin grubunda ise diabet grubuna göre daha düşük olduğu gözlendi. Melatonin uygulamasının diabetik hayvanlarda kan-glikoz düzeyinin zamana bağlı olarak azaldığı tespit edildi. (**Tablo 11**).

	Kontrol	Diabet	Melatonin	Diabet + Melatonin	P
0.Gün	103,20±3.90 ^a	94.40±3.09 ^{a,b}	97.90±2.99 ^{a,b}	90.30±3.16 ^b	0.058
3.Gün	101.30±4.67 ^b	314.50±8.68 ^a	97.20±3.80 ^b	312.60±16.41 ^a	0.00
15.Gün	120.00±3.44 ^c	507.60±21.99 ^a	134.60±3.89 ^c	259.20±49.54 ^b	0.00

Tablo 11: Kan-glikoz düzeyinin gruplar arası karşılaştırılması (P<0.05). a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir (P<0.05).

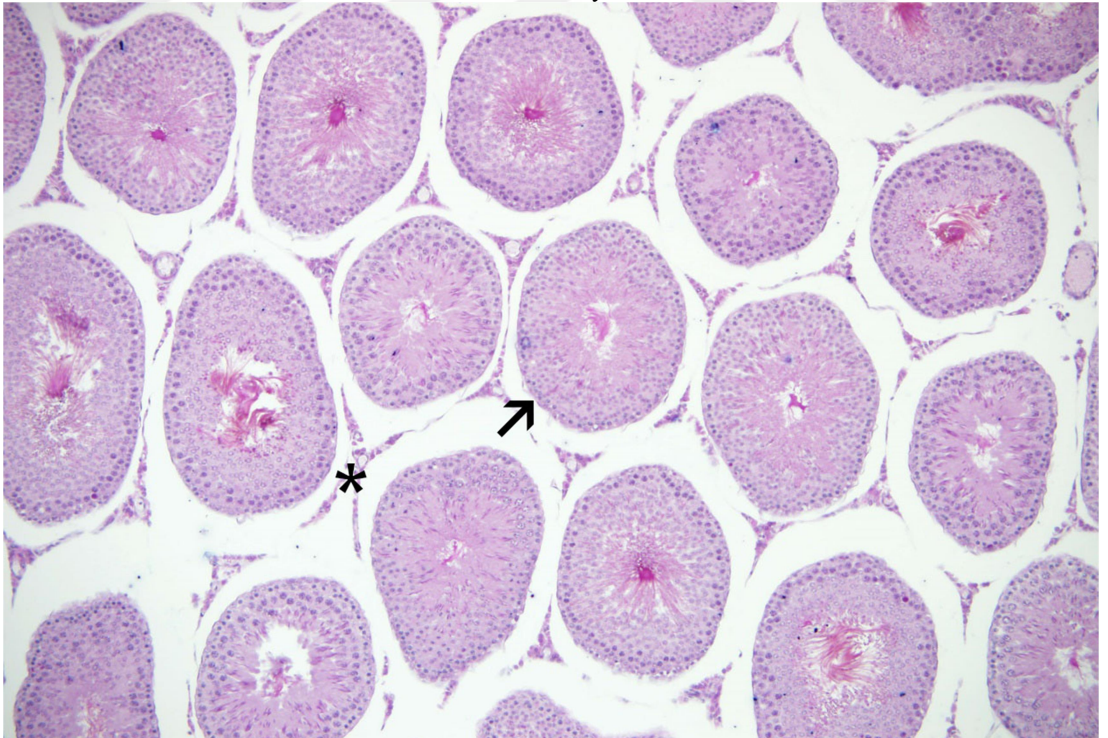
Bu verilere göre, STZ uygulamasını takip eden 72 saatte diabet ve diabet+ melatonin grubu deneklerinde diabet olduğu ve 15 günlük çalışma sürecinin sonuna kadar kan-glikoz düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü.

3.5. Histolojik Değerlendirme Bulguları

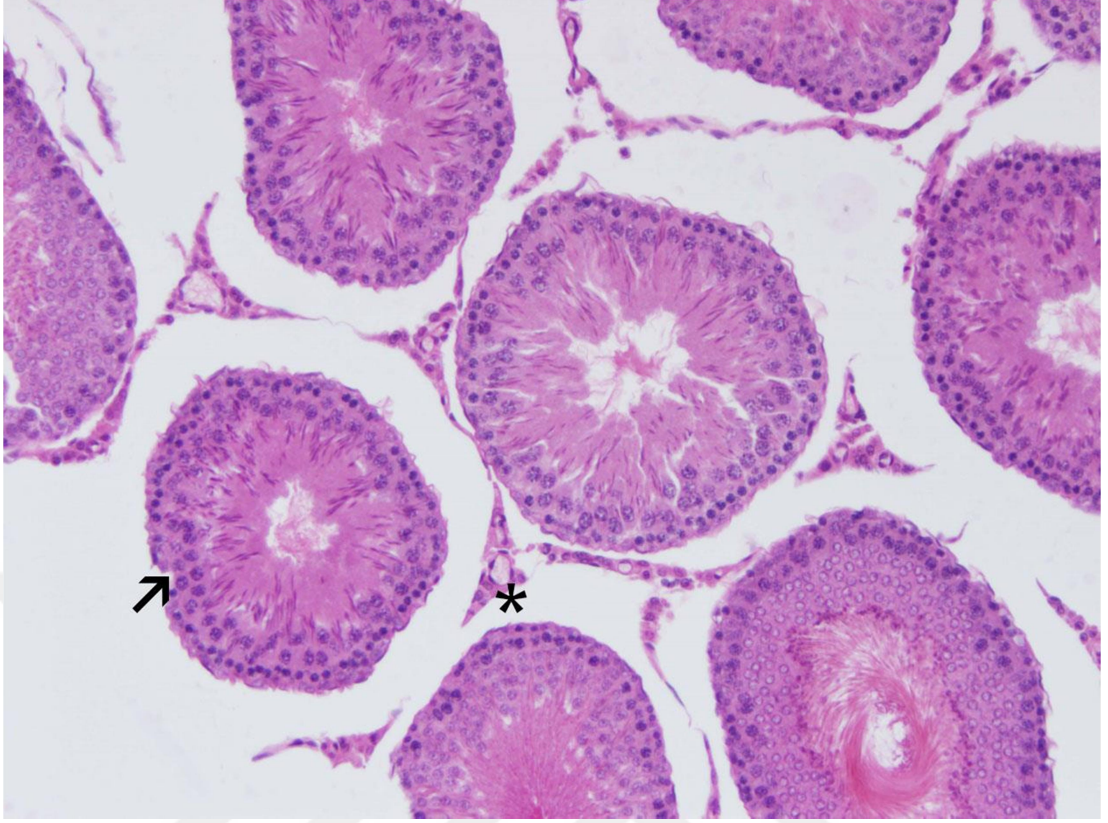
Tüm gruplara ait preparatların yapılan mikroskopik incelemesi sonucu, kontrol grubuna ait örneklerin triple ile boyanan preparatları incelendiğinde tubulus seminiferus kontortusların ve bu tubüllerin içerisinde bulunan spermatogenetik hücre serileri ile intersitisyel alan ve buradaki hücrelerin ve yapıların normal olduğu görüldü (**Resim 1**). Melatonin enjeksiyonu yapılmış ratların testis dokularının histolojik incelemesi için yapılan kesitler incelendiğinde, bu grupta bulunan tubulus seminiferus kontortusların yapısal olarak kontrol grubuna göre herhangi bir histolojik farklılık olmadığı, fakat diğer gruplara göre incelendiğinde seminiferus kontortusların bazal membranlarının daha belirgin ve düzgün yapıda olduğu görüldü. Ayrıca melatonin grubunda tubulus seminiferus kontortuslar içerisinde bulunan, spermatogenezisin devamlılığını sağlayan spermatogonyum, primer ve sekonder spermatozoon, spermatozoon ve sertoli hücrelerinin normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. İntersitisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinin ve damar yapılarında kontrol grubundan farklı olmadığı belirlendi (**Resim 2**). Diabet ve diabet+melatonin gruplarında yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda testis dokusunda bulunan tubulus seminiferus kontortuslar ile burada bulunan spermatogenetik hücre serilerinin ve intersitisyel alanda bulunan yapılar ve Leydig hücrelerinin diğer gruplara göre herhangi bir histolojik farklılık göstermediği belirlendi (**Resim 3,4**).



Resim 1. Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Bar: 100 μ m. Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Yıldız: İntersitisyel alan



Resim 2. Melatonin grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Bar: 100 μ m. Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Yıldız: İntersitisyel alan



Resim 3: Diabet grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H&E .Bar: 50 μ m Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortuslar. Yıldız: İntersitsiyel alan

Yapılan pas boyaması sonucu incelenen preparatlarda tüm gruplarda testis dokusunda tubulus semineforus kontortusları çevreleyen bazal membran yapısının belirgin olduğu tespit edildi (**Resim 4**).



Resim 4: Diabet+melatonin grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Pas boyama. Bar: 10 μ m. Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortusta bazal membran Ok Başı: Leydig hücresi

3.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları

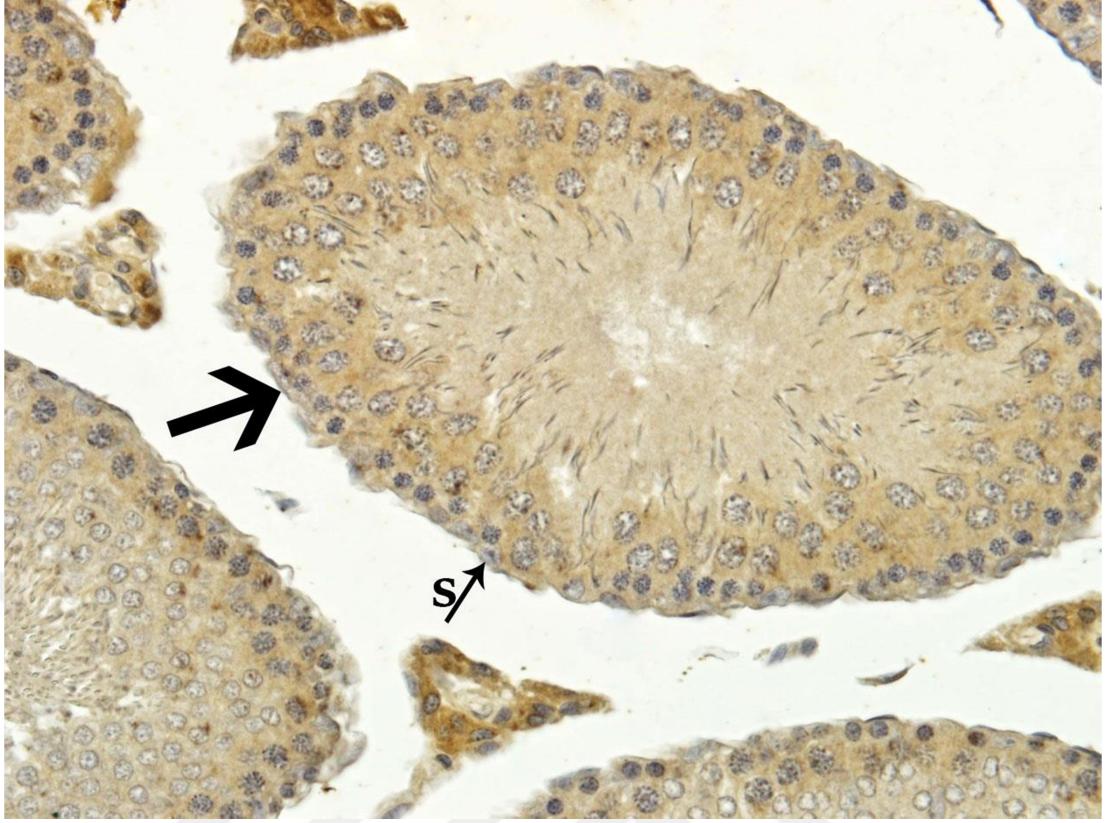
3.6.1. GDF-9 İmmunoreaktivitesi Bulguları

Tüm gruplara ait testis dokusu preparatları GDF-9 immunoreaktivitesi yönünden incelendi. Işık mikroskopik incelemede kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin gruplarında spesifik GDF-9 immunoreaktivitesi olduğu belirlendi (Resim 5,6,7,8).

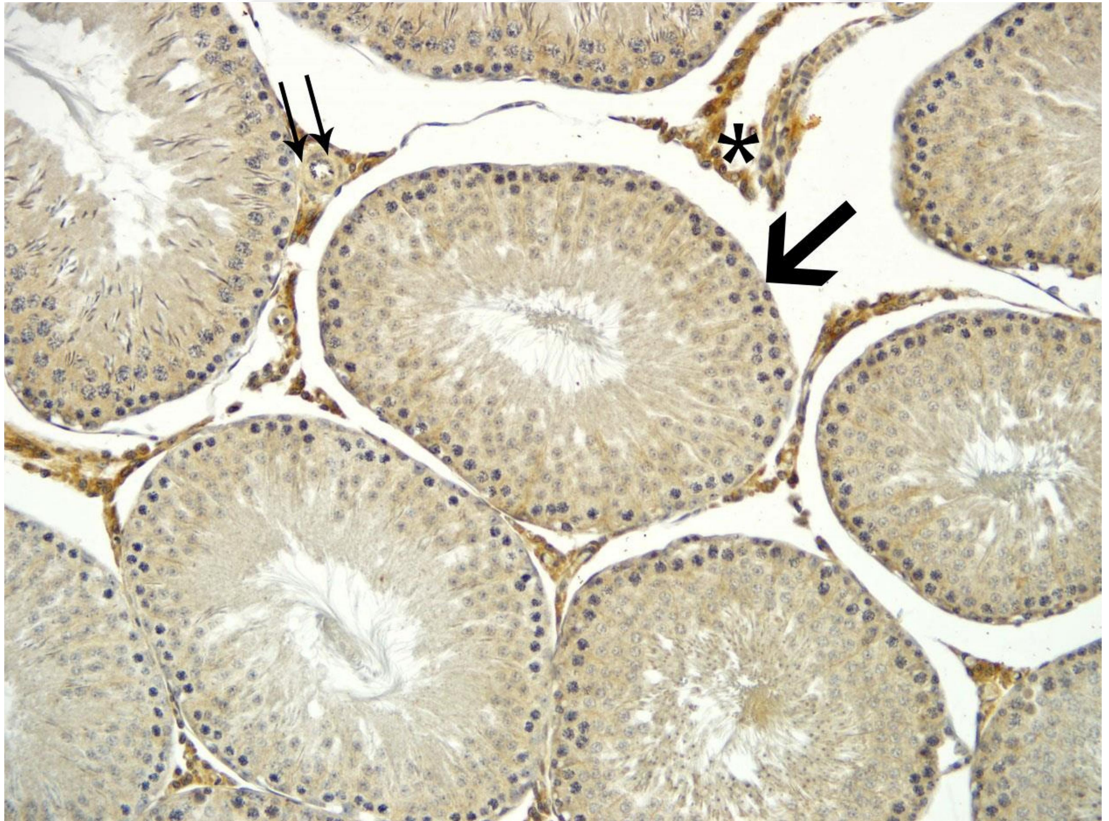
Bütün gruplara ait incelemeler sonucunda GDF-9 immunoreaktivitesinin en yoğun diabet grubunda olduğu (**Resim 5**), melatonin ve diabet+melatonin grubunda ise immunoreaktivitenin benzer yoğunlukta olduğu gözlemlendi (**Resim 6,7**). Kontrol grubunda ise GDF-9 immunoreaktivitesi diğer gruplara göre daha zayıf olduğu tespit edildi. GDF-9 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda Leydig hücrelerinde yoğun olduğu, ancak, seminifer tubüllerde ise spermatogenetik seriye ait hücrelerde sitoplazmik tarzda zayıf bir immunoreaktivite gözlemlendi (**Resim 5,6,7,8**).

Testisteki Yapılar	Reaksiyon Yoğunluğu			
	Kontrol Grubu	Diabet Grubu	Melatonin Grubu	Diabet+ Melatonin grubu
Endotel Hücreleri	+0	+0	+0	+0
Leydig Hücreleri	+1	+3	+2	+2
Spermatogonyum	+0	+2	+1	+1
Primer spermatozoid	+0	+2	+1	+1
Sekonder spermatozoid	+0	+2	+1	+1
Spermatid	+0	+2	+1	+1
Sertoli Hücreleri	+0	+2	+1	+1

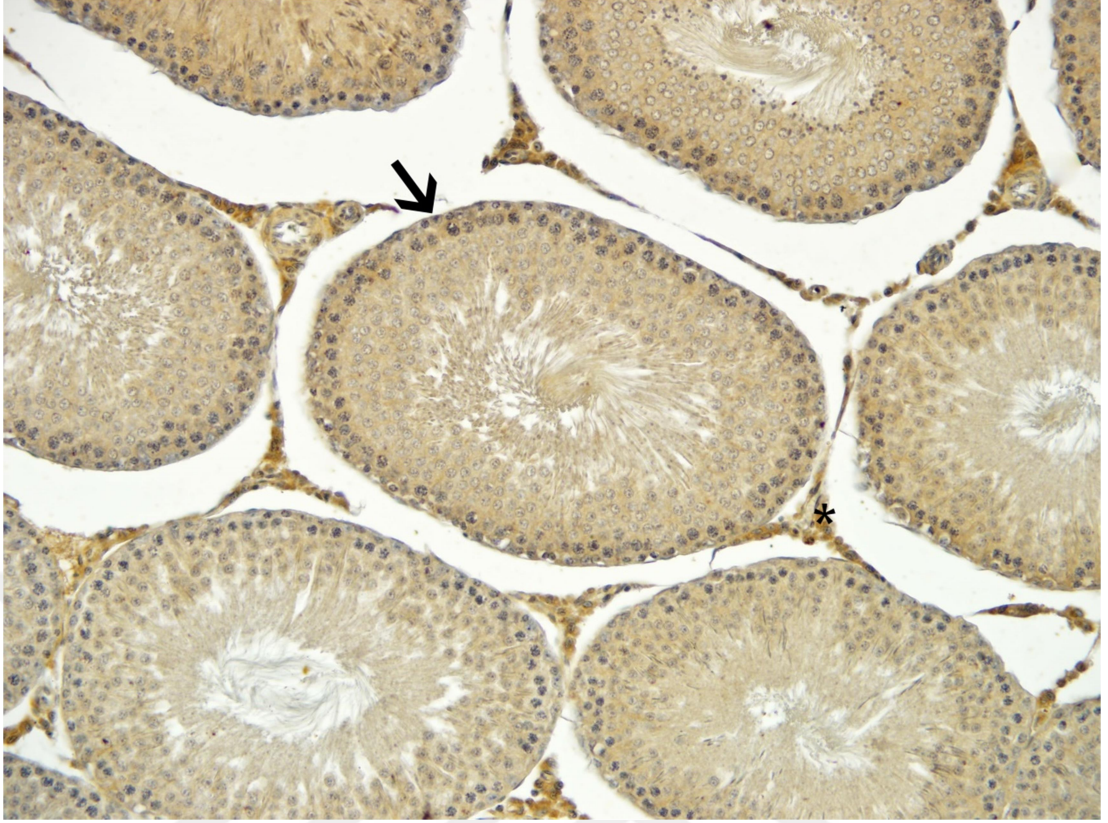
Tablo 12: Testisteki yapılar ve GDF-9 reaksiyon yoğunluğu. (+0): İmmunoreaktivite yok (+1): Az yoğun, (+2): Orta derecede yoğun, (+3): Çok yoğun.



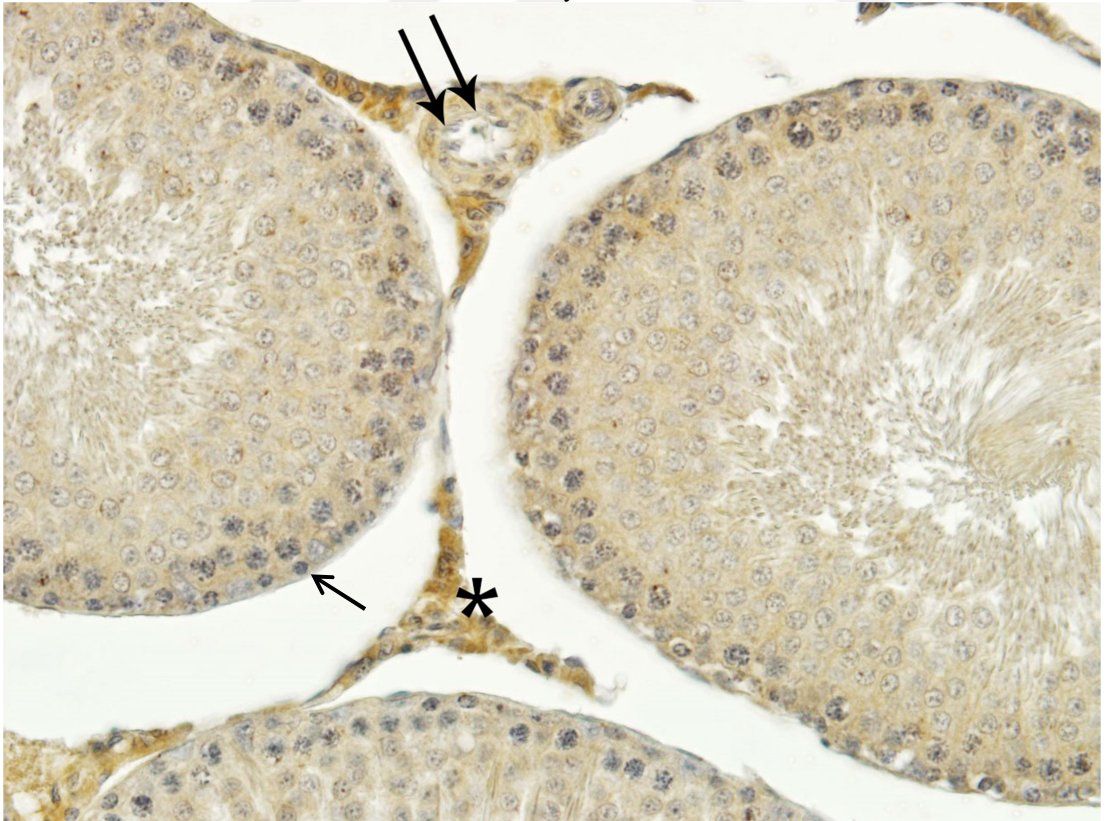
Resim 5: Diabet grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi. Bar: 10 μ m. Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortus, S -Ok :Sertoli hücresi



Resim 6: Melatonin grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 μ m. Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortus, Çift Ok: Kan damarı, Yıldız: İntersitisyel alan

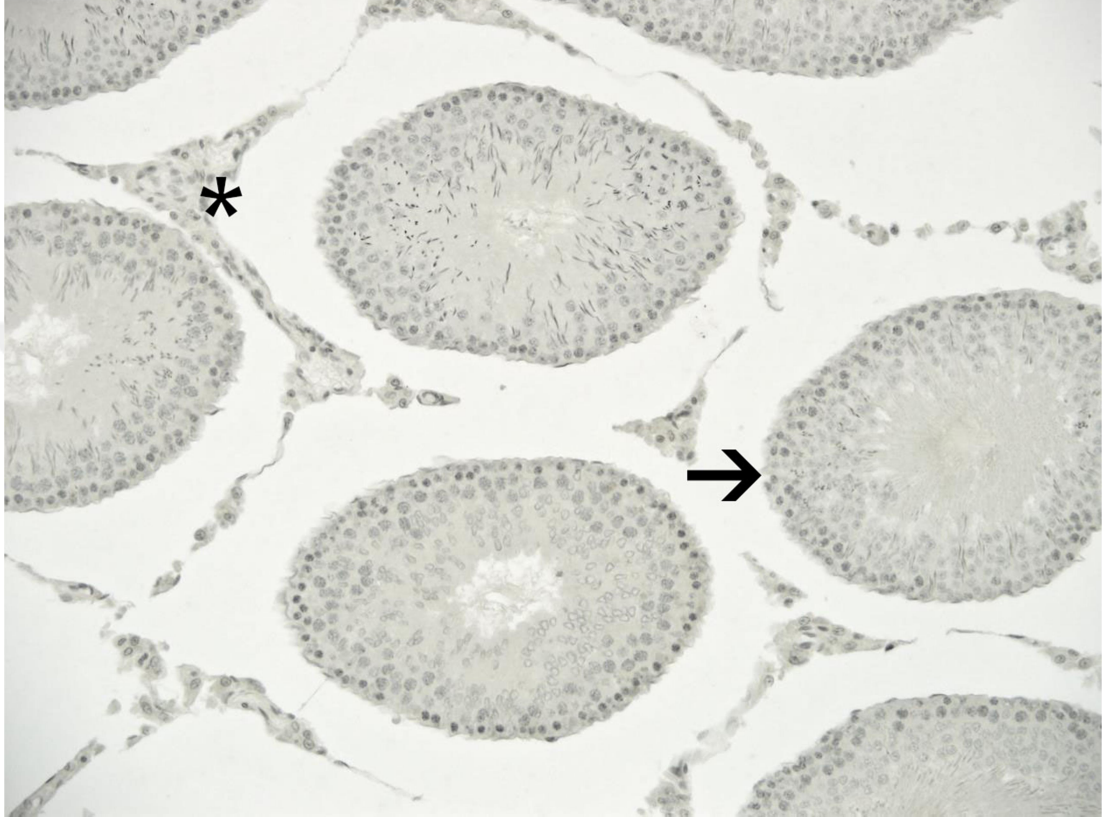


Resim 7: Diabet+Melatonin grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 μ m Kalın Ok: Tubulus seminiferus kontortus, Yıldız: İntersitisyel alan.



Resim 8: Kontrol grubu testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesi. Bar: 10 μ m. Yıldız: intersitisyel alan, Çift ok: Damar endoteli, İnce ok: spermatogonium

Testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitelerinin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacıyla alınan kesitlere primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) bütün işlemler aynı olmak kaydıyla diğer işlemler aynen uygulandı. GDF-9 immunreaktivitesi testis dokusu preparatında gözlenmedi (**Resim 9**)



Resim 9: Kontrol grubu negatif GDF-9 immunreaktivitesi (Negatif kontrol).Bar: 50 μ m. Yıldız: intersitisyel alan, Kalm Ok: Tubulus seminiferus kontortus

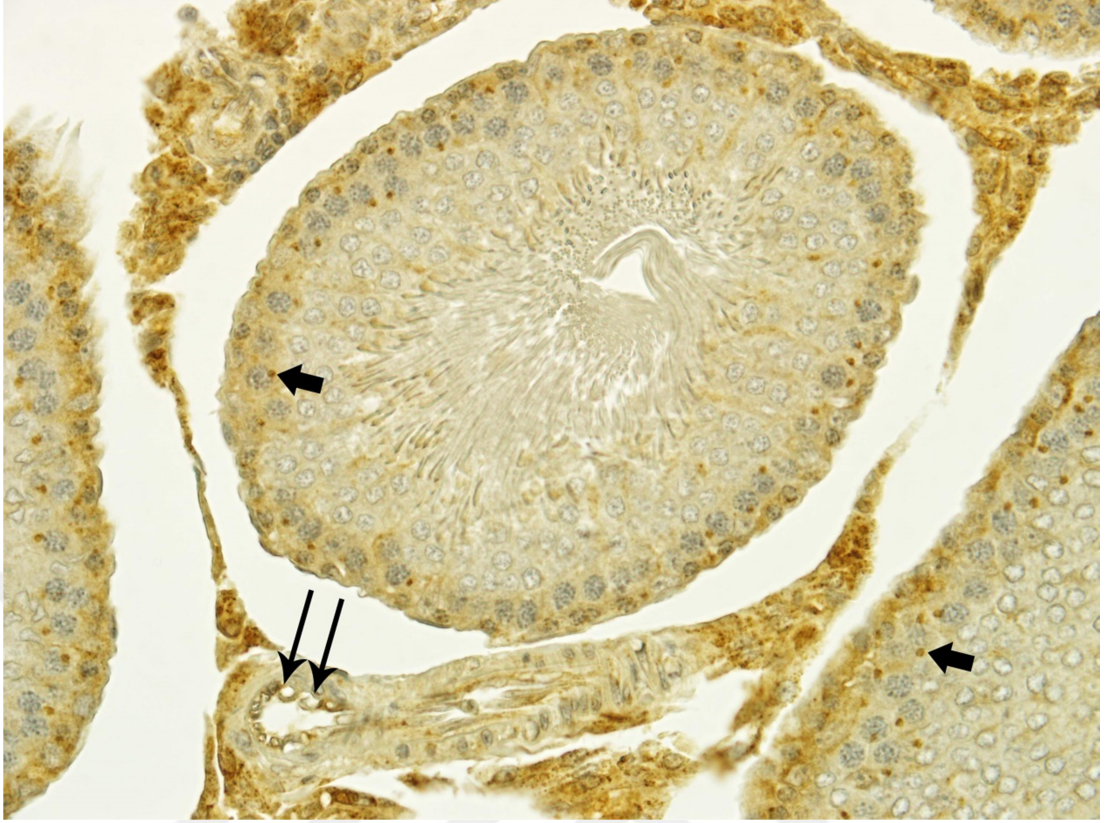
3.6.2. CAT İmmunoreaktivitesi Bulguları

Tüm gruplara ait testis dokusu preparatları katalaz immunoreaktivitesi yönünden ışık mikroskopik düzeyde incelemesinde kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin gruplarında spesifik katalaz immunoreaktivitesi görüldü.

Testis dokuna ait preparat örneklerinde CAT immunoreaktivitesinin en yoğun olarak diabet grubunda olduğu (**Resim10**), diabet+melatonin ve melatonin uygulanan gruplarda benzer olduğu ve diabet grubuna göre daha az immunreaktivite olduğu gözlemlendi (**Resim 11,12**). Kontrol grubundan ise CAT immunoreaktivite yoğunluğunun diğer gruplara göre daha zayıf olduğu tespit edildi (**Resim 13**). Ayrıca bütün gruplarda CAT immunoreaktivitesinin spermatogenetik hücre hattında özellikle sitoplazmik olduğu, bunlardan özellikle primer spermatozoid daha yoğun olduğu gözlemlendi (**Resim 10,11,12,13**). Buna ilaveten primer ve sekonder spermatozoidlerde çekirdeğe eklenik odaklar halinde yoğun immunreaktivite saptandı (**Resim 13**). Bununla birlikte bütün gruplarda seminifer tubüller arasındaki intersitisiyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde ise çoğunlukla hem sitoplazmik tarzda hemde nükleer tarzda CAT immunoreaktivitesi saptandı (**Resim 11**). Diğer yandan intersitisiyel alanda kan damar endotelinde CAT immunoreaktivitesine rastlandı (**Resim 13**).

Testisteki Yapılar	Reaksiyon Yoğunluğu			
	Kontrol Grubu	Diabet Grubu	Melatonin Grubu	Diabet+ Melatonin grubu
Endotel Hücreleri	+1	+3	+2	+2
Spermatogonyum				
Primer spermatozoid	+1*	+1*	+1*	+1*
Sekonder spermatozoid	+1*	+1*	+1*	+1*
Spermatid	+0	+0	+0	+0
Sertoli Hücreleri	+1	+3	+2	+2
Leydig Hücreleri	+1	+3	+2	+2

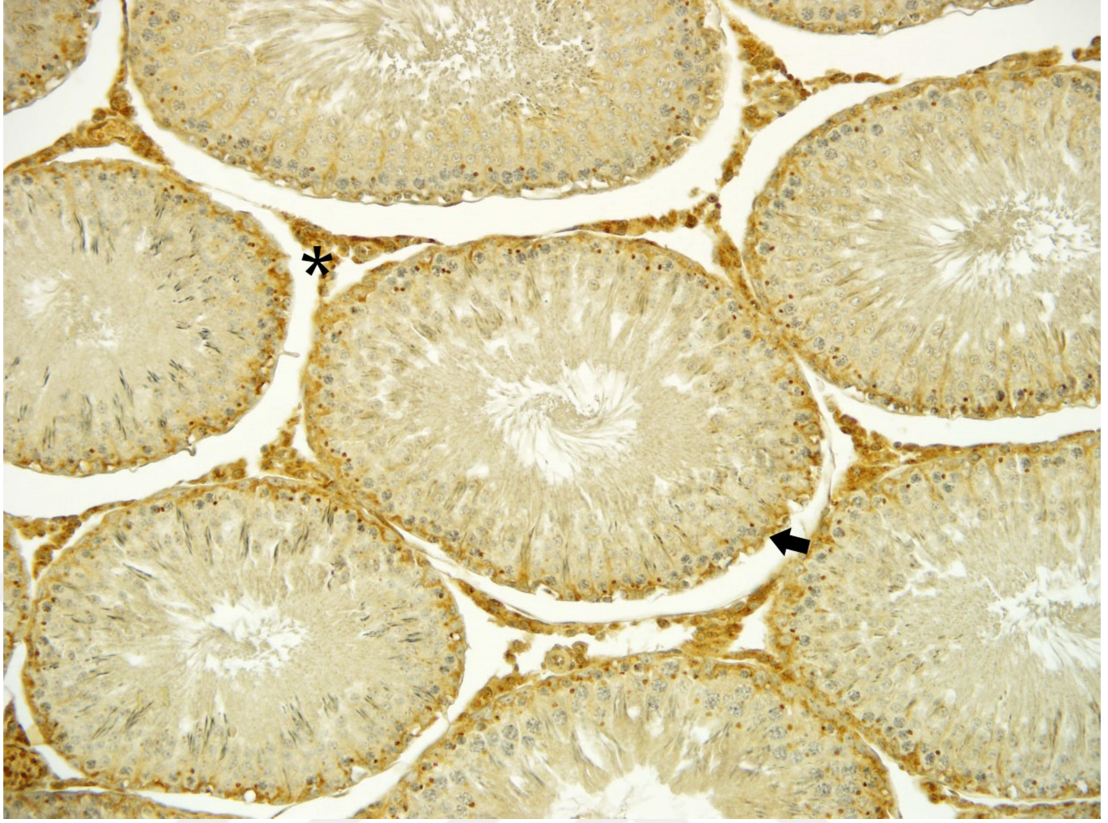
Tablo 13: Testisteki yapılar ve CAT reaksiyon yoğunluğu. (+0): İmmunoreaktivite yok (+1): Az yoğun, (+2): Orta derecede yoğun, (+3): Çok yoğun (*): Çekirdeğe eklenik.



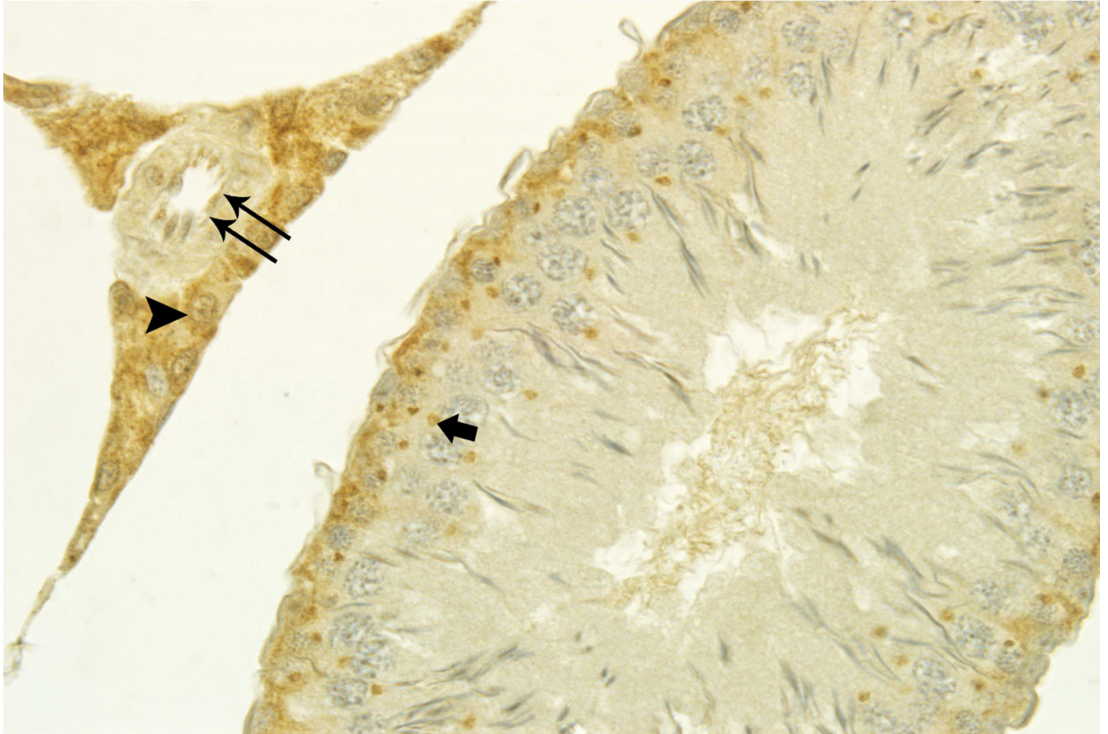
Resim 10: Diabet grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar:10 μm Ok: Primer spermatositlerde sitoplazmik ve eklenik katalaz immunoreaktivitesi, İnce Ok: Endotel hücreleri.



Resim 11: Melatonin grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar:50 μm Ok: Tubulus seminiferus kontortus, kalın ok: primer spermatosit eklenik katalaz immunoreaktivitesi. Yıldız: intersitsiyel alan

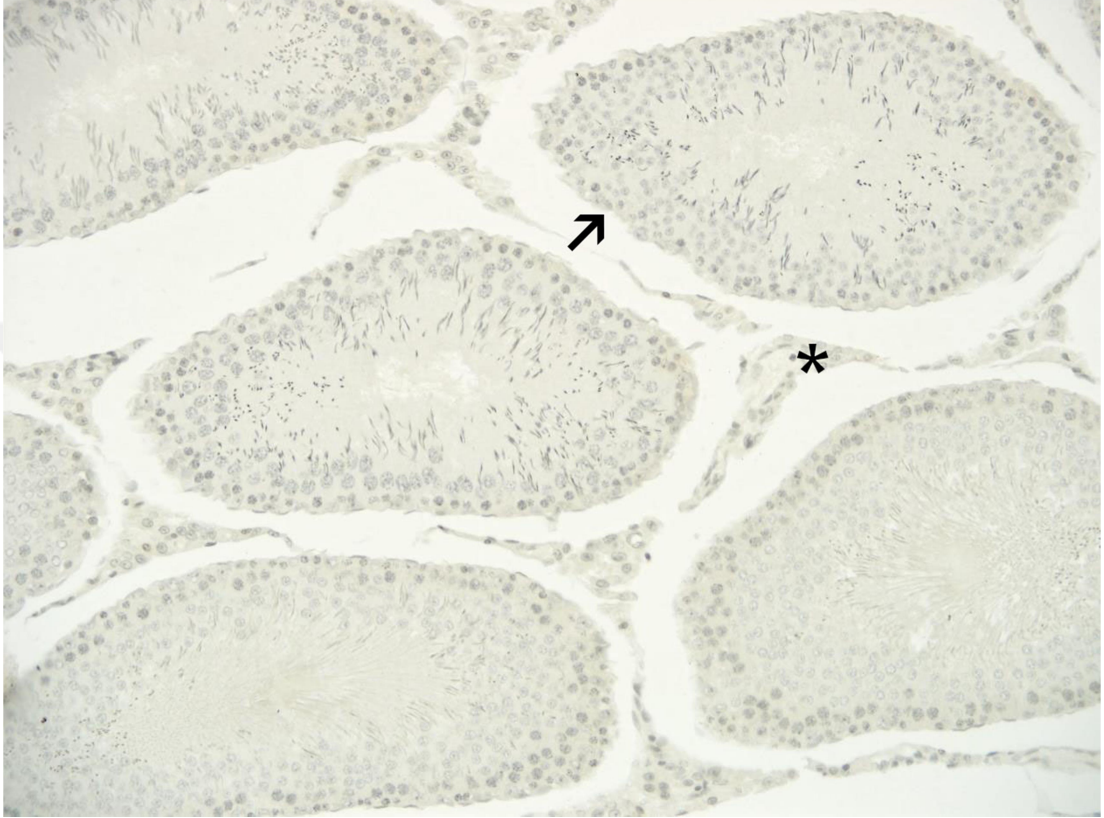


Resim 12: Diabet+Melatonin grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 50 μ m Ok: Tubulus seminiferus kontortus katalaz immunoreaktivitesi. Yıldız: intersitisyel alan



Resim 13: Kontrol grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 5 μ m Ok: Primer spermatositlerde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi, Ok başı: leydig hücresi, Çift ok: Damar endoteli

Testis dokusunda CAT immunoreaktivitelerinin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacıyla alınan kesitlere primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) bütün işlemler aynı olmak kaydıyla diğer işlemler aynen uygulandı. CAT immunreaktivitesi testis dokusu preparatında gözlenmedi (**Resim 14**).



Resim 14: Kontrol grubu negatif Katalaz immunreaktivitesi (Negatif kontrol). Bar: 50 μ m. Yıldız: intersitisyel alan, Ok: Tubulus seminiferus kontortus.

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda streptozotosin (STZ) ile diabet oluşturulan ratlarda melatonin uygulaması ile canlı ağırlıkları, testis ağırlıkları, seminifer tubulüs çaplarındaki değişiklikler incelenmiştir. Bununla birlikte testis dokusunda histolojik değişiklikler ve GDF-9 ve CAT enziminin dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu incelenmiştir.

Bu çalışmamızda *Sprague-Dawley* ırkı ratlara, birçok çalışmaya (Aktaş ve ark. 2011, Karaağaç ve ark. 2011, Roy ve ark. 2013) paralel olarak 50 mg/kg dozunda STZ intraperitoneal (i.p.) uygulanarak diabet oluşturuldu. Kan glikoz düzeyi 200 mg/ dL'nin üzerinde olanları diabetik olarak kabul edildi. Çalışmada diabet oluşumundan sonra, STZ' li diabetli gruptaki ratlara ve sadece melatonin uygulanacak gruptaki ratlara, bazı çalışmalar ile paralel (Guneli ve ark. 2008, Yüzüak ve Aybak 2014) şekilde etanolde çözdürülüp, serum fizyolojikle ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozdaki melatonin 2 hafta boyunca i.p. olarak enjekte edildi.

4.1.Canlı Ağırlık ve Testis Ağırlık Değerlendirmeler

Atilgan ve ark. (2013), çalışmalarında sıçanlarda obezite kaynaklı oksitatif hasar, kilo kaybı ve malatoninin testis üzerine antioksidan etkilerini çalışmışlardır. Sonuç olarak testis dokusunda diğer gruplara göre melatonin uygulanan grupta kilo kaybının azaldığını bildirmişlerdir (Atilgan ve ark. 2013).

Jelodar ve ark (2009), diabetli dişi sıçanlardan doğan erkek sıçanların testis ağırlığında artış olduğunu ancak testis ağırlığının vücut ağırlığına oranında önemli bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir. (Jelodar ve ark. 2009).

Diabetin canlı ağırlığını azalttığını bildiren birçok çalışma vardır (Ercüment ve ark. 1998, Soudamani ve ark. 2005, Koh 2007, Jelodar ve ark. 2009, Kanter ve ark. 2012, Kushwaha ve Jena 2013, Orman ve ark. 2015). Güven ve ark (2006) ise melatonin uygulamasının diabetik sıçanlarda canlı ağırlıkları üzerine bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (Güven ve ark. 2006).

Bizim çalışmamıza paralel olarak Gobbo ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada zamana bağlı kontrol grubuna göre melatonin grubunun eşit düzeyde vücut ağırlığında artış olduğunu, kontrol ve melatonin grubuna göre diabet grubunda vücut ağırlığında azalma olduğu, melatonin uygulanan diabet grubunda ise diabet grubuna göre vücut ağırlığında artış olduğunu bildirmiştir (Gobbo ve ark. 2015).

Yapılan bazı çalışmalarda bizim çalışmamızdan (Gobbo ve ark. 2015) farklı olarak testis ağırlığında bir değişiklik olmadığı ancak bazı çalışmalarda ise bizim bulgularımıza paralel olarak diabetin testis ağırlığını azalttığı bildirilmiştir (Koh 2007, Kanter ve ark. 2012, Atilgan ve ark. 2013, Kushwaha ve Jena 2013, Orman ve ark. 2015).

4.2. Histolojik Değerlendirmeler

Orman ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada patojik olarak kontrol grubunda normal seminifer tubüller gözlerken, diabetli grupta ise tubüllerde vakuolleşme, atrofi ve germ hücrelerde dejenerasyon olduğu ve çekirdeklerin normalden büyük olduğunu, bazalda ise kalınlaşma olduğunu bildirmişlerdir (Orman ve ark. 2015).

Akkoç ve ark (2012), diabetik grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında seminifer tubül bazal membranının kalınlaştığını bildirmişlerdir (Akkoç ve ark. 2012). Şişman ve ark. (2014), ise diabetik sıçanlarda bazal membran da kalınlaşma olduğunu bildirmişlerdir (Şişman ve ark. 2014).

Kanter ve ark (2012), çalışmalarında kontrol grubunda seminifer tubüllerin normal gözlendiğini, diabetik sıçanlarda ise testis dokusunda seminifer tubüllerin yapısında küçülme ve bozulmalar olduğunu belirtmiştir. Diabetik sıçanların spermatogenik hücre serilerinde önemli bir azalmanın olduğunu, tubüllerde ise atrofının tespit edildiğini bildirmişlerdir (Kanter ve ark. 2012).

Aslan ve ark. (2015), yaptıkları çalışmalarda sigara dumanına maruz kalan ratlarda testis hasarı üzerine melatoninin ve yararlı etkilerini araştırmışlardır. Melatonin uygulamasının ratların testis dokusunda spermatogonyumların ve spermatozoidlerin sayısında artışa yol açtığını bildirmişlerdir (Aslan ve ark. 2015).

Ercüment ve ark (1998), çalışmaları sonucu diabetik ratların seminifer tubüllerinde kontrol grubuna göre bozulmalar olduğu, spermatid sayısında belirgin azalmanın olduğunu. İntertisyel alanın boyut ve sayı açısından normal olduğunu bildirmişlerdir. (Ercüment ve ark. 1998).

Guneli ve ark. (2008), diabetin tubulus seminiferusun bazal membranını kalınlaştırdığı, diabette bazal membranda kalınlaşma ve germ hücrelerin dejenere olduğunu bulmuşlardır. Melatonin uygulamasının ise herhangi bir düzeltmeye yol açmadığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında diabetin testiküler fonksiyon bozukluğuna neden olduğunu ancak melatonin uygulanmasının iyileştirici etkilerinin olduğunda bildirmişlerdir (Guneli ve ark. 2008).

Yapılan çalışmalarda (Cai ve ark. 2000, Kanter ve ark. 2012, 2013), histolojik incelemeler sonucu sıçan testis dokusunun yanı sıra, diabetik insan testis dokusunda (Cameron ve ark. 1985) seminifer tubüllerde spermatogenik hücrelerin azaldığı, seminifer tubül epitelinin kalınlaştığı, seminifer tubülde vakuolleşme ve atrofinin olduğu ve de bunun sonucunda spermatogenez yetmezliği olduğu bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada tüm gruplarda yapılan mikroskopik incelemeler sonucu yapılan çalışmalardan (Ercüment ve ark. 1998, Guneli ve ark. 2008, Akkoç ve ark. 2012, Kanter ve ark. 2012, Orman ve ark. 2015) farklı olarak diabet grubunda tubulus seminiferus kontortuslarda ve bazal mebranında diğer gruplara göre histopatolojik farklılık olmadığını gözlemledik. Ancak melatonin uygulanan grupta testis dokusunun yapısı diğer gruplara göre mikroskopik olarak incelendiğinde yuvarlak ve daha düzgün yapıda tubulus semineferus kontortusların olduğunu görüldü.

4.3. Histometrik Değerlendirmeler

Yapılan bazı çalışmalarda (Soudamani ve ark. 2005, Akkoç ve ark. 2012, Kanter ve ark. 2012, Orman ve ark. 2015) diabetin seminifer tubül çapında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Şişman ve ark. (2014) ise diabetik sıçanlarda seminifer tubül bazal membranın da kalınlaşmış olduğunu bildirmişlerdir (Şişman ve ark. 2014). Ercüment ve ark (1998) ise çalışmaları sonucu diabetik ratların seminifer

tübül çaplarının azaldığı ve bazal membranın incelendiğini bildirmişlerdir (Ercüment ve ark. 1998).

Ayrıca çalışmalarda (Guneli ve ark. 2008, Ricci ve ark. 2009, Khaki ve ark. 2010, Kanter ve ark. 2012), diabetik sıçanların testis dokusunda seminifer tübüllerde bozulma olduğu, tübül boyutunda küçülme ve atrofi gözleendiği spermatogenik hücre serilerinde azalma olduğu bildirilmiştir.

Guneli ve ark. (2008), çalışmalarında diabet grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübül çapında azalma olduğu ancak melatonin uygulanmış diabetli grupta melatoninli gruba göre farklılık olmadığını bildirmişlerdir (Guneli ve ark. 2008).

Jeodar ve ark. (2009), çalışmalarında diabetli dişi sıçanlardan doğan erkek sıçanların seminifer tübül çaplarının düşük olduğunu bildirmişlerdir (Jelodar ve ark. 2009).

Yaptığımız çalışmada testis dokusu kesitlerinde tubulus seminiferus kontortus çap değerinin kontrol ve melatonin grubun da tübül çapının benzer olduğu, diabet+melatonin grubunun diabet grubuna göre artış gözlenirken, diabet grubunda birçok çalışmaya (Guneli ve ark. 2008, Jelodar ve ark. 2009, Orman ve ark. 2015) paralel seminifer tübül çapında diğer gruplara göre azalma olduğu gözlenmiştir.

4.4. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

4.4.1. GDF-9 İmmunohistokimyasal Değerlendirmeleri

Son zamanlarda in vitro verilerde GDF-9'un spermatogenezisi düzenlediği düşünülmektedir. GDF-9'un sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarında (kan-testis bariyeri) inhibe olduğu gözlenmiştir (Fitzpatrick ve ark. 1998, Aaltonen ve ark. 1999, Pennetier ve ark. 2004). Fitzpatrick ve ark.(1998), GDF-9'un insan ve kemirgenlerde nonovarian dokularda eksprese olduğunu iletmişlerdir (Fitzpatrick ve ark. 1998).

Nicholls ve ark.(2009), çalışmalarında denek olarak yetişkin sıçan kullanmışlardır ve GDF-9' un testis dokusunda spermatogenez sırasında sinyal ekspresyonunu incelemişlerdir. Testis dokusunda spermatogenez başlangıcında

spermatidlerde yüksek seviyelerde GDF-9 mRNA ekspresyonunun olduğu ve sertoli hücrelerinde de bulunduğunu bildirmişlerdir (Nicholls ve ark. 2009).

Zhao ve ark. (2011), çalışmalarında kedi testisinde GDF-9 immunohistokimyasına bakmışlardır ve Leydig hücrelerinde yoğun immunreaktivite olduğu, seminifer tubüllerin sertoli hücresinde primer ve sekonder spermatositlerin sitoplazmasında ve spermatidlerde daha az immunoreaktivite gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Zhao ve ark. 2011).

He ve ark. (2012), yılan balığının testis dokusunda GDF-9 immunoreaktivitesini incelemişlerdir ve germ hücrelerinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. GDF-9 özellikle spermatogonyumların ve spermatositlerin sitoplazması yoğun olarak, spermatidlerde ise düşük immunreaktivitede olduğunu belirtmişlerdir (He ve ark. 2012).

Guo ve ark. (2013), çalışmalarında yetişkin albaka hayvanlarında testis dokusunun GDF-9 immunoreaktivitesine bakmışlardır. Testis dokusunda immunoreaktivitesi bakımından GDF-9 primer spermatositlerde, seminifer tubüllerin bazalında ve yuvarlak spermatidlerin sitoplazmalarında gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Guo ve ark. 2013).

Roy ve ark. (2013), çalışmalarında diabetli sıçanlarda büyüme faktörü ailesinden oluşan TGF- β 1 ve IL-1 immunoreaktivitesinin arttığını bildirmişlerdir.(Roy ve ark. 2013)

Pongsa-Asawapaiboon ve ark. (1998) çalışmalarında melatonin sinir büyüme faktörü (NGF)'e etkisini yetişkin erkek farelerde immunohistokimyasal olarak incelemişlerdir ve melatonin uygulanan grupta NGF büyüme faktörünün arttığını bildirmişlerdir (Pongsa-Asawapaiboon ve ark. 1998).

Çalışmamızda alınan testis doku kesit preparatlarına ait incelemeler sonucunda tüm gruplarda GDF-9 immunoreaktivitesinin yapılan çalışmalara (Pongsa-Asawapaiboon ve ark. 1998, Roy ve ark. 2013) paralel olarak gözlemledik. GDF-9 immunoreaktivitesi en yoğun diabet grubunda olduğunu, melatonin ve diabet+melatonin grubunda ise immunoreaktivite benzer yoğunlukta olduğu kontrol

grubunda ise diğer gruplara göre en az yoğunlukta olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer olarak Roy ve ark. (2013) büyüme faktörünün diabetli dokuda arttığını bildirmişlerdir. Ancak yapılan literatür araştırmaları sonucu çalışmamıza benzer bir literatüre rastlanmadı. Zhao ve ark. (2011) yaptıkları çalışmaya paralel GDF-9 immunoreaktivitesi tüm gruplarda Leydig hücrelerinde yoğun olarak gözlemlendi. Buna ilaveten yapılan çalışmalara (Fitzpatrick ve ark. 1998, Nicholls ve ark. 2009, Zhao ve ark. 2011, He ve ark. 2012, Guo ve ark. 2013) benzer şekilde seminifer tubüllerde spermagenetik seriye ait hücrelerde zayıf bir immunoreaktivite gözlemlendi.

4.4.2. CAT İmmunohistokimyasal Değerlendirmeleri

Koral Taşçı ve ark. (2016), çalışmalarında melatonin uygulamasının böbrek dokusunda katalaz üzerine etkisinin immunohistokimyasal olarak incelemişlerdir. Melatonin uygulamasının katalaz immunoreaktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Koral Taşçı ve ark. 2016).

Orman ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada diabet oluşumundan dolayı testiküler hasara karşı aminoguananinin (AG) maddesinin antioksidan etkisini araştırmışlardır. Diabetli AG ile tedavi edilen grupta diabet sonucu oluşan oksidatif strese karşı antioksidanlardan katalazın (CAT) arttığı, diabetik grupta ise CAT enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Selvaratnam ve Robaire (2016), fare testislerinde CAT'ın testis dokusunda immünlokalizasyon ve Western blot analizini yapmışlardır. CAT'ın seminifer tubüllerde germ hücreleri sitoplazmasında lokalize olduğunu ve Leydig hücrelerinde yüksek seviyede lokalize olduğunu, CAT'ın protein düzeyleri karaciğer ve testislerde yüksek düzeyde bulunduğunu belirtmişlerdir. Farelerde CAT reaksiyonun yaşa bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir (Selvaratnam ve Robaire 2016).

Nenicu ve ark. (2007), çalışmalarında fare testis dokusunda immunofloresans tekniği ile immunoelektron mikroskopunda katalaz enziminin Leydig hücrelerinde çok yoğun olduğunu, spermatozoid ve spermatidlerde zayıf bir immunoreaktivite gösterdiğini ve elektron mikroskopunda ise spermatogonyumda katalaz reaktivitesi olduğunu belirtmişlerdir. Aynı tekniği kullanarak insan testis dokusunda Leydig

hücrelerinde ve seminifer tubülün bazal bölgelerinde özellikle sertoli hücrelerinde katalaz enzim immunoreaktivitesinin gözleendiğini bildirmişlerdir (Nenicu ve ark. 2007).

Zini ve Schlegel (1996), rat testisinde katalaz mRNA'sının in situ lokalizasyonu ve gelişimsel modeline göre bu enzimin interstisyel alanda ekspresyonunu öne sürmektedir. Bu çalışmaya göre mRNA ekspresyonunun öncelikle peritubuler ve interstisyel hücrelerde olduğu bildirilmiştir (Zini ve Schlegel 1996). Akondi ve ark (2011), diabetik grupta katalaz (CAT) düzeyinin azaldığını belirtmişlerdir (Akondi ve ark. 2011).

Çalışmamızda tüm gruplar incelendiğinde diğer çalışmalardan (Akondi ve ark. 2011, Orman ve ark. 2015) farklı CAT immunoreaktivitesinin en yoğun olarak diabet grubunda olduğu, diabet+melatonin ve melatonin uygulanan gruplarda çok benzer olduğu gözleendi. Kontrol grubundan ise CAT immunoreaktivitesinin diğer gruplara göre yoğunluğunun daha az olduğu tespit edildi. Ayrıca bütün gruplarda CAT immunoreaktivitesinin spermatogenetik hücre hattında özellikle sitoplazmik olduğu bunlardan özellikle primer spermatosit daha yoğun olduğu gözleendi. Buna ilaveten yapılan çalışmalardan farklı olarak primer spermatositlerde çekirdeğe eklenik odaklar halinde peroksizom organeli olabileceğini düşündüğümüz yapıda yoğun immunoreaktivite saptandı ve bununla ilgili herhangi bir litaretüre raslanmadı. Bizim çalışmamızda Nenicu ve arkadaşları (2007) ile Selvaratnam ve Robaire'nin (2016) yaptığı çalışmaya benzer olarak Leydig hücrelerinde katalaz immunreaktivitesi gözlenmiştir. Çoğunlukla Oberley ve ark. (1990) çalışmalarında olduğu gibi hem sitoplazmik tarzda hemde nükleer CAT immunoreaktivitesi saptandı.

4.5. SONUÇ

Çalışmamızda histolojik incelemeler sonucu, kontrol, diabet, melatonin ve diabet+melatonin uygulanan gruplar arasında histolojik olarak herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Tüm grupların canlı ağırlığının diabet grubunda en düşük olduğu, kontrol ve melatonin grubunun istatistiksel düzeyde benzer olduğu ve diabet+melatonin grubuna göre artmış olduğu gözleendi. Testis ağırlığının ise kontrol grubunda en yüksek olduğunu, melatonin ve diabet+melatonin grubunun istatistiksel düzeyde benzer olup diabet grubuna göre artmış olduğu belirlendi. Histometrik olarak ise seminifer

apının diabet grubunda en az olduğu belirlendi. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda GDF-9 ve CAT immunoreaksiyonu en yoğun olarak diabet grubunda, melatonin ve diabet+melatonin grubunda ise benzer yoğunlukta ve diabet grubuna göre daha az yoğunlukta olduğu ve kontrol grubunda ise diğer gruplara göre en az reaksiyon olduğu gözlenmiştir. Bununda diabette artan serbest radikallere bağlı olarak CAT immunoreaktivitesinde artışa sebep olabileceğini, diğer yönden güçlü bir antioksidan olan melatonin uygulamasının diabette enzim aktivitesini düzenleyici bir role sahip olduğunu dşunmekteyiz. Diabetik sıçanlarda GDF-9 immunoreaktivitesinde diğer gruplara göre yoğun olması, diabetin testis hasarına karşı büyüme faktörlerinin olumlu etkisinin olduğunu ve deney süresinin az oluşundan dolayı testis dokusunda histopatolojik etkiyi azalttığını dşunmekteyiz. Melatonin uygulanmasının ilk olarak serbest radikallerin seviyelerinin azalmasına neden olduğunu, testis hasarına bağlı gelişen oksidan/antioksidan dengeyi olumlu yönde etkilediğini gördük. Bu bulgular deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan diabetin testis hasarında, güçlü bir antioksidan olan melatonin uygulamasının infertilitenin önlenmesi için umut verici bir tedavi yöntemi olabileceğinin dşunmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R: Human Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) and Its Novel Homolog GDF-9B Are Expressed in Oocytes during Early Folliculogenesis 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(8): 2744-2750, 1999.
- Abdel-Ghani MA, El-sherry TM, Abdelhafeez HH: Effect of growth differentiation factor-9 (GDF-9) on the progression of buffalo follicles in vitrified-warmed ovarian tissues. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5): 795-803 2016.
- Abeer AS: Role of aminoguanidine on the testis of streptozotocin-induced diabetic albino rat, a light and electron microscopic study. *Egypt J Histol*, 33: 451-466, 2010.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R: Review article: clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(1): 2-11, 2008.
- Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SEM: Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction*, 22(7): 1871-1877, 2007.
- Agrawal A, Prabhakaran SA, Sikka SC: Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Ser*, 26:1-12, 2007.
- Ak H, Dingiloğlu T, Habif N: Plasma lipid peroxidation, Vit. E, superoxide dismutase and glutathione peroxidase alterations in coronary atherosclerosis. *Tr J Med Sci*, 26: 11-15, 1994.
- 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*, 8(1): 1841-0987, 2012.
- 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.
- Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimosza Yayınları, p. 1995.
- Akondi RB, Kumar P, Annapurna A, Pujari M: Protective Effect of rutin and naringin on sperm quality in streptozotocin (STZ) induced type 1 diabetic rats. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(3): 585, 2011.
- Aktaş C, Kanter M, Erboğa M, Timurkan H: Effects of experimental diabetes on testis proliferations and apoptosis in rats. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 28(3): 94-98, 2011.
- Alaçam E: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite In. Eds: Medisan, 1999.
- Altan N, Dinçel AS, Koca C: Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turk J Biochem*, 31(2): 51-56, 2006.
- Altay B, Çetinkalp Ş, Doğanavşargil B, Hekimgil M, Semerci B: Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertility and sterility*, 80: 828-831, 2003.
- Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos j: Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Current diabetes reviews*, 4(1): 46-54, 2008.

- American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes care*, 33, Supplement 1: 11-61, 2010.
- Aslan H, Kesici H, Karaca ZI, Özyurt B, Taş U, Ekici F, Erdoğan H, Gevrek F, Cayli S: Beneficial effects of melatonin and BQ-123 on the rat testis damage caused by cigarette smoke. *Turkish journal of medical sciences*, 45(1): 11-17, 2015.
- Atalay M, Laaksonen DE: Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of sports science and medicine*, 1(1): 1-14, 2002.
- Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, Erdemir F, Kilic S, Erkorkmaz U, Ozyurt H, Markoc F: Weight loss and melatonin reduce obesity-induced oxidative damage in rat testis. *Advances in urology*, 2013.
- Aydın A, Sayal A, Işimer A: Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Aydın Kitabı*, Ankara, 2001.
- Aytekin Ö: Veteriner Özel Histolojisi. In: Eds: Dora Yayıncılık, 251-268, 2016.
- Baker MA, Aitken RJ: Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1): 67, 2005.
- Banks WJ: *Applied veterinary histology*, Williams & Wilkins, p. 1986.
- Bennet PH: Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. In: *Textbook of Diabetes*. Eds: Publications BS. London, 37-44, 1991.
- Beyer CE, Steketee JD, Saphier D: Antioxidant properties of melatonin—an emerging mystery. *Biochemical pharmacology*, 56(10): 1265-1272, 1998.
- Bitzer J, Alder J: Diabetes and female sexual health. *Women's Health*, 5(6): 629-636, 2009.
- Borjigin J, Zhang LS, Calinescu A-A: Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Molecular and cellular endocrinology*, 349(1): 13-19, 2012.
- Cabadak H: *Hücre siklusu ve kanser*. 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.
- Canalis E: Clinical review 35: Growth factors and their potential clinical value. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(1): 1-4, 1992.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR: Bone morphogenetic proteins. *Growth factors*, 22(4): 233-241, 2004.
- Cross JC: The genetics of pre-eclampsia: a fetoplacental or maternal problem? *Clinical genetics*, 64(2): 96-103, 2003.
- Çimen Ç, Çiğdem Ö, Demir H, Savran A: Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1): 15-20, 2005.

- Denek Z: Trifluralin uygulanmış erkek sıçanlarda resveratrolün ürogenital sistem üzerine terapötik etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması, DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2010.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM: Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. 1996.
- Du P, Ye L, Li H, Ruge F, Yang Y, Jiang W: Growth differentiation factor-9 expression is inversely correlated with an aggressive behaviour in human bladder cancer cells. *cancer*, 5: 9, 2012.
- El-Sokkary GH, Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Cabrera J: Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*, 34(6): 842-850, 1999.
- El-Missiry MA, Shalaby F: Role of β -carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 14(5): 238-243, 2000.
- Ercüment U, İsmail C, Bülent Ö, Leyla M: Diabetik ratlarda selenyumun spermatogenezi koruyucu etkisi. 1998.
- Fatani AJ, Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Al-Assaf A, Parmar MY, Ahmed MM: Lutein Dietary Supplementation Attenuates Streptozotocin-induced testicular damage and oxidative stress in diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1): 1, 2015.
- Ficher M, Zuckerman M, Fishkin RE, Goldman A, Neeb M, Fink PJ, Cohen SN, Jacobs JA, Weisberg M: Do endocrines play an etiological role in diabetic and nondiabetic sexual dysfunctions? *Journal of andrology*, 5(1): 8-16, 1984.
- Fidanol Z: Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların testis dokularında p38 MAPK immünreaktivitesinin incelenmesi. 2012.
- Fisher MD, Delbert A: Metabolism and Effects of Epidermal Growth Factor and Related Growth Factors in Mammals. *Endocrine Reviews*, 11(3): 418-442, 1990.
- Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler IJ, Frail DE: Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues I. *Endocrinology*, 139(5): 2571-2578, 1998.
- Gobbo MG, Costa CFP, Silva DGH, de Almeida EA, Góes RM: Effect of melatonin intake on oxidative stress biomarkers in male reproductive organs of rats under experimental diabetes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ: Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of andrology*, 17: 276-287, 1996.
- Gope R: The effect of epidermal growth factor & platelet-derived growth factors on wound healing process. *Indian Journal of Medical Research*, 116: 201, 2002.
- Guneli E, Tugyan K, Öztürk 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.
- Guo QY, Gao ZZ, Zhao L, He JP, Dong CS: Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9), ALK5, and claudin-11 in adult alpaca testis. *Acta Histochemica*, 115(1): 16-21, 2013.

- Güven A, Yavuz Ö, Cam M, Ercan F, Bukan N, Comunoğlu C, Gökçe F: Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochemica*, 108(2): 85-93, 2006.
- Ha H, Yu M-R, Kim KH: Melatonin and taurine reduce early glomerulopathy in diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7): 944-950, 1999.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, USA, p. 2015.
- HAMPL R, Drabkova P, Kandar R, Stepan J: Impact of oxidative stress on male infertility. *Ceska gynekologie/Ceska lekarska spolecnost J. Ev. Purkyne*, 77(3): 241-245, 2012.
- He Z, Wu Y, Xie J, Wang T, Zhang L, Zhang W: Growth differentiation factor 9 (GDF-9) was localized in the female as well as male germ cells in a protogynous hermaphroditic teleost fish, ricefield eel *Monopterus albus*. *General and comparative endocrinology*, 178(2): 355-362, 2012.
- Hidalgo-Tamola J, Chitaley K: Review. *The journal of sexual medicine*, 6(4): 916-926, 2009.
- Hsu S-M, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(4): 577-580, 1981.
- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T: Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of reproduction*, 61(2): 393-399, 1999.
- 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: *Temel Histoloji*. In: Y. AYTEKİN, S. SOLAKOĞLU. Eds: Nobel Tıp Kitabevi, 431-470, 2006.
- Kanitkar M, Bhonde R: Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *The Review of Diabetic Studies*, 1(4): 185, 2004.
- Kanter M, Aktas C, Erboga 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, Erboga 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.
- Karaağaç N, Salman F, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M: Changes in prooxidant-antioxidant balance in tissues of rats following long-term hyperglycemic status. *Endocr Res*, 36(3): 124-133, 2011.
- Karabaş Kuru M: *Diyabetik nefropati oluşturulmuş ratlarda pioglitazonun antioksidan parametrelere ve patolojik süreçlere etkileri*, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi. 2009.
- Karabulut AB: *Hepatit B'li hastalarda eritrosit ve lenfosit antioksidan enzimler, nitrik oksit aktiviteleri ile plazma sitokinleri*. 2001.
- 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.

- Kierszenbaum AL: Histoloji ve Hücre Biyolojisi. In: Eds: Demir R. Ankara: Palme Yayıncılık, 531: 535-538, 2006.
- Koh P-O: Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(9): 969-971, 2007.
- Koral Taşçı S, Deprem T, Bingöl SA: Effect of Melatonin on Catalase Enzyme in Mouse Kidney Tissue. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22, 6, 2016.
- Koral Taşçı S, Gülmez N: Immunohistochemical distribution of glutathione peroxidase and its gene expression via RT-PCR in the liver tissue of melatonin-administered mice. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38(2): 145-150, 2014.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM: Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics*, 15(2): 201-204, 1997.
- Kushwaha S, Jena GB: Telmisartan ameliorates germ cell toxicity in the STZ-induced diabetic rat: Studies on possible molecular mechanisms. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755(1): 11-23, 2013.
- Lee J-A, Jeong HJ, Park H-J, Jeon S, Hong S-U: Acupuncture accelerates wound healing in burn-injured mice. *Burns*, 37(1): 117-125, 2011.
- Luna LG: *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 1968.
- MacLean JA, Wilkinson MF: Gene regulation in spermatogenesis. *Current topics in developmental biology*, 71: 131-197, 2005.
- MacLeod J: The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 138(3): 512-518, 1943.
- Maldjian A, Penny PC, Noble RC, De Vriese SR, Christophe AB: *Male fertility and lipid metabolism*. Male fertility and lipid metabolism, 2003.
- Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha-Junior CMC, Lima-Verde IB, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR: Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reproduction, fertility and development*, 20(8): 916-924, 2008.
- Massague J: How cells read TGF- β signals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(3): 169-178, 2000.
- Mccord JM: Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical biochemistry*, 26(5): 351-357, 1993.
- McPherron AC, Lee SJ: GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5): 3444-3449, 1993.
- Meister AMEA, Anderson ME: Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1): 711-760, 1983.
- Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX: Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *Journal of cellular biochemistry*, 53(4): 373-382, 1993.
- Morris CJ, Aeschbach D, Scheer FAJL: Circadian system, sleep and endocrinology. *Molecular and cellular endocrinology*, 349(1): 91-104, 2012.

- Nenicu A, Lüers GH, Kovacs W, Bergmann M, Baumgart-Vogt E: Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biology of reproduction*, 77(6): 1060-1072, 2007.
- Nicholls PK, Harrison CA, Gilchrist RB, Farnworth PG, Stanton PG: Growth differentiation factor 9 is a germ cell regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology*, 150(5): 2481-2490, 2009.
- Oberley TD, Oberley LW, Slattery AF, Lauchner LJ, Elwell JH: Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult Syrian hamster tissues and during kidney development. *The American journal of pathology*, 137(1): 199, 1990.
- Olgun N, Yalın H, Demir HG: Diyabetle mücadelede diyabet risklerinin belirlenmesi ve tanılama. *Turkish Family Physician*, 2(2): 36-44, 2011.
- 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.
- Orozco TJ, Wang JF, Keen CL: Chronic consumption of a flavanol-and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(2): 104-110, 2003.
- Öztürk F, Ağkadir M, Yağmurca M: Deneysel diyabetin sıçan testislerindemeydana getirdiği histolojik değişiklikler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22(2): 173-178, 2002.
- Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C: The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 55: 109-119, 1999.
- Peng X, Yang M, Wang L, Tong C, Guo Z: In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(5): 247-257, 2010.
- Pennetier S, Uzbekova S, Perreau C, Papillier P, Mermillod P, Dalbiès-Tran R: Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15 and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biology of reproduction*, 71(4): 1359-1366, 2004.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F: Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life sciences*, 55(15): 271-276, 1994.
- Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Åkerblom HK, Sariola H, Andersson SM: Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life sciences*, 50(5): 335-339, 1992.
- Pongsa-Asawapaiboon A, Asavaritikrai P, Withyachumnarnkul B, Sumridthong A: Melatonin increases nerve growth factor in mouse submandibular gland. *Journal of pineal research*, 24(2): 73-77, 1998.
- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer chemotherapy reports*, 1(29): 91-98, 1963.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S: Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and Metabolic Research*, 29(08): 363-372, 1997.

- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña Castroviejo D: A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 18(1): 1-11, 1995.
- Reiter RJ, Tan D-X, Osuna C, Gitto E: Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of biomedical science*, 7(6): 444-458, 2000.
- 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.
- Roy S, Rahaman N, Ahmed F, Metya S, Sannigrahi S: Naringenin attenuates testicular damage, germ cell death and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: naringenin prevents diabetic rat testicular damage. *Journal of Applied Biomedicine*, 11(3): 195-208, 2013.
- Selvaratnam J, Robaire B: Overexpression of catalase in mice reduces age-related oxidative stress and maintains sperm production. *Experimental Gerontology*, 84: 12-20, 2016.
- Shah SM, Saini N, Singh MK, Manik R, Singla SK, Palta P, Chauhan MS: Testicular cell-conditioned medium supports embryonic stem cell differentiation toward germ lineage and to spermatocyte-and oocyte-like cells. *Theriogenology*, 2016.
- Sharma RK, Agarwal A: Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6): 835-850, 1996.
- Shi Y, Massagué J: Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6): 685-700, 2003.
- Shu S, Ju G, Fan L: The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience letters*, 85(2): 169-171, 1988.
- Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG: Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of andrology*, 16: 464-468, 1995.
- Silva PFN: Physiology of peroxidation process in mammalian sperm, PhD thesis. Utrecht University, Ridderprint, Ridderkerk, 2006.
- Soudamani S, Malini T, Balasubramanian K: Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocrine research*, 31(2): 81-98, 2005.
- SPSS Inc: Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0., Chicago.
- Steenfos HH: Growth factors and wound healing. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, 28(2): 95-105, 1994.
- Steger RW, Kienast SG: Effect of continuous versus delayed insulin replacement on sex behavior and neuroendocrine function in diabetic male rats. *Diabetes*, 39(8): 942-948, 1990.
- Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6): 537-546, 2001.
- Şener G, Yeğen BÇ: İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg*, 22(3): 5-13, 2009.
- Şişman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, Aksu I, Guvendi G, Uysal N: Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor Beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers*, 108106, 2014.

- Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M: Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(8): 2949-2952, 2008.
- Tanyolaç A: Özel Histoloji. In. Eds: Fakültesi AÜV, 1999.
- Tekcan AGM: Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *Infertilite, Androloji Bülteni*, 37: 131-136, 2009.
- Van Zoelen E: Polypeptide growth factors and their role in regulating the cell cycle. *Molecular biology in reproductive medicine*, 65-77, 1999.
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJW: In Vivo Treatment with GDF-9 Stimulates Primordial and Primary Follicle Progression and Theca Cell Marker CYP17 in Ovaries of Immature Rats. *Endocrinology*, 141(10): 3814-3820, 2000.
- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J: IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 94(3): 311-321, 2011.
- Yalçınkaya FR, Ardiçoğlu A, İlhan N, Işıl U, Baltacı AKK: Radyasyon Hasarının Testis ve Böbreklerdeki Malonyldialdehit Düzeyi (MDA) Üzerine Etkisi ve Melatonin ile Önlenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 1, 2009.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL: Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15(6): 854-866, 2001.
- Yıldız M, Şahin B, Şahin A: Acute effects of oral melatonin administration on arterial distensibility, as determined by carotid-femoral pulse wave velocity, in healthy young men. *Experimental & Clinical Cardiology*, 11(4): 311, 2006.
- Yılmaz B: Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. In: Ankara. Eds: Matbaacılık F, 1999.
- Yüzüak H: The possible protective effect of melatonin on streptozotocin induced experimental diabetes. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5(4): 592-598, 2014.
- Yüzüak H, Aybak M: Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabette melatoninin olası koruyucu etkisinin araştırılması. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5, 4, 2014.
- Zhao L, He JP, Guo QY, Wen XX, Zhang XJ, Dong CS: Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9) and its receptor in adult cat testis. *Acta Histochemica*, 113(8): 771-776, 2011.
- Ziaei-Rad M, Vahdaninia M, Montazeri A: Research Sexual dysfunctions in patients with diabetes. a study from Iran, 2010.
- Zini A, Schlegel PN: Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *Journal of andrology*, 17: 473-480, 1996.

6.ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara'da doğdum. İlköğretim, ortaokul ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladıktan sonra Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü 2012 yılında tamamladım. 2013 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladım.

