

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABET VE
İSKEMİ-REPERFÜZYONDA LİRAGLUTİDİN TESTİS
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sinem HAZIR

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Hülya ÖZGÜR**

ADANA-2016

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABET VE İSKEMİ-REPERFÜZYONDA LİRAGLUTİDİN TESTİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Sinem HAZIR

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Hülya ÖZGÜR

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2015-3889'nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....
ADANA-2016

KABUL ve ONAY





TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve tamamlanması sırasında her konuda desteklerini ve güler yüzünü esirgemeyen, tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hülya Özgür'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarım sırasında ve eğitim aldığım süre boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sait Polat ile çalışma olanağımın sağlanmasında katkılarından dolayı Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Doç. Dr. Kenan Dağlıoğlu ve personellerine, tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah Tuli'ye ve Öğr.Gör.Dr. Ebru Dünder'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na, çalışmalarım sırasında bana her aşamada destek olan Yrd.Doç.Dr.Leman Sencar'a, Yrd.Doç.Dr.Yurdun Kuyucu'ya ve Arş.Gör.Gülfidan Çoşkun'a, Anabilim Dalımız teknisyenleri Adile Sarıcalar, Nevriz Dural ve Zuhal Özkurt'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte büyük bir özveriyle beni destekleyen, her anımda yanımda olan canım annem Adalet Hazır'a, babam Mustafa Hazır'a ve abim Serkan Hazır'a, şanslı olduğumu hissettiren nişanlım Burak Bayhan'a, dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yük. Lis. Öğr. Sinem Hazır

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testis	4
2.2. Seminiferöz Tübül	6
2.3. Sertoli Hücreleri	8
2.4. Spermatojenik Hücreler	9
2.4.1. Spermatogonyumlar	11
2.4.2. Spermatozitler	11
2.4.3. Spermatoitler	12
2.4.4. Spermatozoon	15
2.5. İnterstisyum ve Leydig Hücreleri	16
2.6. Kan Testis Bariyeri	17
2.7. Liraglutid	17
2.8. Testiküler İskemi Ve Reperfüzyon	19
2.8.1. Torsiyonun Fertilite Üzerine Etkileri	20
2.8.2. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı	21
2.8.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisinde Rol Oynayan Sistemler	21

2.9. Diyabetes Mellitus	22
2.9.1. Diyabetes Mellitus Tipleri	23
2.9.2. Diyabetes Mellitus ve Erkek İnfertilitesi	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Deney Düzeneği	25
3.2. Işık Mikroskopik Takip Yöntemleri	28
3.3. Elektron Mikroskopik Takip Yöntemleri	29
3.4. İmmünohistokimya Yöntemleri	30
3.5. Biyokimyasal Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	33
4.1.1. Grup 1	33
4.1.2. Grup 2	34
4.1.3. Grup 3	35
4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular	37
4.2.1. Grup 1	37
4.2.2. Grup 2	40
4.2.3. Grup 3	45
4.3. İmmunohistokimya Bulguları	53
4.3.1. Grup 1	54
4.3.2. Grup 2	54
4.3.3. Grup 3	56
4.4. Biyokimyasal Bulgular	58
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1.	Deney gruplarının şematik gösterimi	26
Çizelge 2.	Işık mikroskopik doku takip işlemi	28
Çizelge 3.	Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon, şeffaflandırma ve immersiyon işlemi	29
Çizelge 4.	Gömme materyali içeriği	30
Çizelge 5.	Serum MDA, SOD ortalama değerleri	58
Çizelge 6.	Serum testosteron ortalama değerleri	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa No:
Şekil 1.	İnsan testisinin şematik görünümü	6
Şekil 2.	İnsan seminiferöz tübül epitelinin şematik çizimi	7
Şekil 3.	Spermatojenik hücre serisinin şematik gösterimi	10
Şekil 4.	Spermiogenezisin şematik gösterimi	14
Şekil 5.	Spermatozoon şematik çizimi	16
Şekil 6.	İnsan GLP-1 ve liraglutidin aminoasid yapısı	19
Şekil 7.	Torsiyon yapılmış testis gösterimi	27
Şekil 8.	Torsiyonlu testisin görünümü	27
Şekil 9.	Detorsiyonlu testisin görünümü	27
Şekil 10.	Grup 1. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	34
Şekil 11.	Grup 1. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	34
Şekil 12.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	34
Şekil 13.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	34
Şekil 14.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	35
Şekil 15.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	35
Şekil 16.	Grup 3a. Torsiyon grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	36
Şekil 17.	Grup 3a. Torsiyon grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	36
Şekil 18.	Grup 3b. Torsiyon/ Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	36
Şekil 19.	Grup 3b. Torsiyon/ Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	36
Şekil 20.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	37
Şekil 21.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görünümü. Boya: Hematoksilen- Eozin	37
Şekil 22.	Grup 1. Kontrol grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	39
Şekil 23.	Grup 1. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	39
Şekil 23 a.	Grup 1. Kontrol grubuna ait over dokusunun elektron mikroskopik görünümü	39
Şekil 24.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	41
Şekil 24 a.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	41
Şekil 25.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	41
Şekil 26.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	42
Şekil 27.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	43
Şekil 27 a.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	43
Şekil 28.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	44
Şekil 28 a.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	44

Şekil 29.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	44
Şekil 30.	Grup 3a. Torsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	46
Şekil 31.	Grup 3a. Torsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	46
Şekil 32.	Grup 3a. Torsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	47
Şekil 33.	Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	48
Şekil 34.	Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	48
Şekil 35.	Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	49
Şekil 36.	Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	49
Şekil 37.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+ Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	51
Şekil 38.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+ Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	51
Şekil 39.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+ Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	52
Şekil 40.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+ Liraglutid grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	52
Şekil 41.	Pozitif kontrol grubuna ait tonsil dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	53
Şekil 42.	Negatif kontrol grubuna ait tonsil dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	53
Şekil 43.	Kontrol grubuna ait testis dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	54
Şekil 44.	Grup 2a. Diyabet grubuna ait testis dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	55
Şekil 45.	Grup 2b. Diyabet+Liraglutid grubuna ait testis dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	55
Şekil 46.	Grup 3a. Torsiyon grubuna ait testis dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	56
Şekil 47.	Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait testis dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	57
Şekil 48.	Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+ Liraglutid grubuna ait testis dokusunun immünohistokimyasal görünümü.	57
Şekil 49.	Serum testosteron düzeyinin grafiksel görünümü	59

SİMGELELER ve KISALTMALAR

I/R	: İskemi-Reperfüzyon
T/D	: Torsiyon-Detorsiyon
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
NO⁻	: Nitrik Oksit
O₂⁻	: Süperoksit Anyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
OH⁻	: Hidroksil Radikalleri
DETAUM	: Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 β
MDA	: Malondialdehit
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositler
SOD	: Süperoksit Dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
DM	: Diyabetes Mellitus
GLP-1	: Glukagon-Benzeri Peptit-1
GIP	: Glukoz Bağımlı İnsülinotropik Peptit
Hb A1c	: Hemogloblin A1c
SER	: Agranüler Endoplazmik Retikulum
GER	: Granüler Endoplazmik Retikulum
DPP-4	: Dipeptidil peptidaz-4
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
GİS	: Gastrointestinal Sistem

ÖZET

Deneysel Olarak Oluşturulan Diyabet ve İskemi-Reperfüzyonda Liraglutidin Testis Üzerine Etkileri

Testiküler torsiyon, neonatal ve ergenlik döneminde sıklıkla görülen ürolojik bir problemdir. Testiküler torsiyondaki temel patoloji, torsiyonu takiben serbest oksijen radikalleri tarafından oluşturulan doku hasarı ile birlikte ortaya çıkan biyokimyasal ve yapısal değişikliklerdir. Diyabetes Mellitus; insülin eksikliği ve/veya insülin direnci sonucu kanda glukoz seviyesinin yükselmesine bağlı olarak gelişen, akut ve kronik komplikasyonlara neden olabilen, sistemik bir hastalıktır. Literatürde glisemik kontrol için liraglutid uygulaması rapor edilmiştir. Ayrıca son yıllarda özellikle tip 2 diyabet hastalarında böbrek, kalp, mide, bağırsak, beyin, pankreas, over, karaciğer ve adipoz doku gibi, çeşitli organ ve dokularda da deneysel araştırmalar yapılmıştır. Erkek üreme sistemi üzerine liraglutidin etkisiyle ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Sunulan çalışmada deneysel olarak diyabet oluşturulan ve iskemi/reperfüzyon uygulanan sıçanlarda testiste, liraglutidin antidiyabetik, antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda Wistar albino cinsi toplam 36 adet erkek sıçan kullanıldı. Kontrol grubu (Grup 1, n=6), diyabet grubu (Grup 2, n=12), torsiyon grubu (Grup 3, n=18) olmak üzere denekler 3 gruba ayrıldı. 2.grup sıçanlarda, 50 mg/kg streptozosin uygulamasından 72 saat sonra kan glukoz seviyeleri ölçüldü, > 300 mg/dL olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Diyabetik sıçanlar da kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı. 2a grubu sıçanlar, 14 gün boyunca normal koşullarda yaşatılırken, 2b grubuna 14 gün boyunca 0,3 mg/kg liraglutid günde 2 kez subkutan olarak uygulandı. 3. grup sıçanların sol testisleri 720° döndürülerek torsiyon gerçekleştirildi. Torsiyon yapılan bu grup sıçanlar da kendi içerisinde 3 alt gruba ayrıldı. 3a grubu denekler, 3 saatlik torsiyondan sonra sakrifiye edildi. 3b grubundaki sıçanların ise testislerine 3 saatlik torsiyon sürecinden sonra detorsiyon yapıldı ve 14 gün yaşatıldı. 3c grubuna torsiyonun 2. saatinde subkutan olarak 0,3 mg/kg liraglutid enjekte edildikten 1 saat sonra detorsiyon yapıldı ve ardından 14 gün boyunca, günde 2 kez liraglutid enjeksiyonuna devam edildi. Sakrifikasyondan önce sıçanlardan alınan kan örneklerinde MDA, SOD ve testosteron ölçümleri yapıldı. Elde edilen testis doku örnekleri ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için hazırlandı. Ayrıca testis doku kesitlerinde, apoptotik marker olan kaspaz-3 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak araştırıldı.

Çalışmamızda; ışık mikroskopik olarak diyabet (Grup 2a), torsiyon (Grup 3a) ve torsiyon/detorsiyon (Grup 3b) gruplarında seminiferöz tübüllerde dejenerasyon ve interstisyumda ödem gözlenirken, ince yapı düzeyinde elektron dens Sertoli hücre sitoplazmasında dev lipid damlacıkları, SER vakuolizasyonu ve dejenere mitokondriyonlar dikkati çekti. Ayrıca spermatojenik hücrelerde büzüşmeler ve apoptotik

değişiklikler izlendi. Liraglutid uygulanan gruplarda ise, ışık mikroskopik düzeyde nispeten normale yakın bir morfoloji gözlenirken, ince yapı düzeyinde; bazı tübüllerde çift çekirdekli anormal spermatidlere, lümende immatür, fagositik ve apoptotik hücelere rastlandı. İmmünohistokimyasal bulgulara 2a, 3a ve 3b gruplarında, kaspaz-3 ekspresyonu belirgin olarak gözlenirken, 2b ve 3c gruplarında, kontrol grubuna benzer ekspresyon elde edildi. Biyokimyasal analizlerde; 2a, 3a ve 3b gruplarında MDA seviyelerinde artış, SOD ve testosteron düzeylerinde azalma görüldü. 2b ve 3c gruplarında; SOD, MDA ve testosteron seviyelerinin kontrol grubuna yakın olduğu dikkati çekti.

Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde; liraglutidin diyabet ve torsiyon/detorsiyon gruplarında meydana gelen yapısal değişiklikler ile hormon seviyeleri üzerine olumlu etkilerinin, uzun süreli kullanımda daha etkin olabileceği düşünöldü. Liraglutidin, testise etkileri ile ilgili ileri araştırmaların yapılması ve buna yönelik bilgilerin artmasıyla, gelecekte diyabet hastalarında ve/veya torsiyon/detorsiyon vakalarında, testis yapısı ve fonksiyonunun korunmasında, alternatif bir tedavi ajanı olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Diyabet, GLP-1 analog, liraglutid, testis, torsiyon

ABSTRACT

Effects of liraglutide on the testis in experimental diabetic and ischemia-reperfusion injury

Testicular torsion is an urological condition appeared frequently in adolescents and neonatal periods. The basic pathology of testicular torsion is tissue damage that occurs along with biochemical and morphological changes, following the generation of reactive oxygen species by torsion. Diabetes mellitus is a systemic disease which can cause chronic and acute complications induced by rising in glucose level of the blood as a result of insulin deficiency, insulin resistance or a combination of both. In recent years, liraglutide application has been reported for glycemic control of type 2 diabetic patients specifically. Also experimental studies are reviewed in various organs and tissues such as kidney, heart, stomach, intestine, brain, pancreas, ovary, liver and adipose tissue. However, we found only a few studies about the effects of liraglutide on the male reproductive system in the literature. Therefore, the aim of our study was to investigate the antidiabetic, antioxidative and antiapoptotic effects of liraglutide on the rat testis which were experimentally subjected to diabetes and ischemia/reperfusion injury.

In our study, 36 male adult Wistar albino rats were divided into 3 groups: control group (Group 1, n=6), diabetes group (Group 2, n=12), torsion group (Group 3, n=18). Blood glucose levels of rats in group 2 were measured 72 hours after 50 mg/kg streptozocin application and > 300 mg/dl glucose levels were considered as diabetic. Also these diabetic rats were divided into 2 subgroups. Rats in group 2a kept alive for 14 days under normal conditions, while rats in group 2b were administered 0.3 mg/kg liraglutide subcutaneously two times in a day for 14 days. Torsion was created by rotating the left testis 720° in rats of group 3. Then rats in group 3 were divided into 3 subgroups. Rats in group 3a were sacrificed 3 hours after torsion. Rats in group 3b were survived for 14 days after detorsion following the 3 hours torsion period. Rats in group 3c were injected 0.3 mg/kg liraglutide subcutaneously at the second hour of torsion, one hour after injection detorsion was created and injection was continued 2 times a day for 14 days. MDA, SOD, and testosterone levels measured from blood samples of sacrificed rats. Also testicular tissue samples were examined with using light and electron microscope. Expression of apoptotic marker caspase-3 in testis tissue sections were shown immunohistochemically.

In our study, degenerations in seminiferous tubules and edema in the interstitium were observed in the light microscopic examination of diabetes (Group 2a), torsion (Group 3a) and torsion/detorsion (Group 3b) groups. In the ultrastructural examination of these groups; giant lipid droplets, SER vacuolizations and degenerative mitochondria were

remarked in the electron dens Sertoli cell cytoplasm. Also shrinkages and apoptotic changes in the spermatogenic cells were shown. On the other hand, in light microscopic examinations, group 2b and group 3c were observed relatively in normal morphology. But in the electron microscopic examination of these groups, anormal spermatids with double nuclei, immature, phagocytic and apoptotic cells were found in the lumen of some seminiferous tubules. While caspase-3 expressions were observed in group 2a, group 3a and group 3b, group 2b and 3c showed similar expressions with the control group. Furthermore, MDA levels of group 2a, group 3a and group 3b were increased, also SOD and testosterone levels were decreased. But in group 2b and group 3c, SOD, MDA and testosterone levels were found similar with the control group.

When all the findings were evaluated together, it was thought that positive effects of liraglutide on structural changes and hormon levels in diabetes and torsion/detorsion groups could be more effective with long-term using. It is considered that, in future with further studies and increasing in knowledge about effects of liraglutide on testis, liraglutide can be an alternative therapeutic agent for preserving structure and function of testis in patients with diabetes and cases with torsion/detorsion.

Keywords: Diabetes, GLP-1 analogue, liraglutide, testis, torsion

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu, spermatik kordun kendi etrafında dönmesiyle ortaya çıkan önemli bir sağlık sorunudur¹. Çocuklarda akut skrotal rahatsızlıkların yaklaşık %10-15'ini oluşturan testiküler torsiyonun % 42'si orşiektomiyle sonuçlanmaktadır². Kan akımında düşüşe sebep olan testiküler torsiyonda, iskemi ve reperfüzyon (I/R) sonucu doku hasarına neden olan serbest oksijen radikalleri (ROS) ortaya çıkmaktadır^{3,4}. Testiküler torsiyondaki temel patoloji; torsiyonu takiben ROS tarafından oluşturulan doku hasarı ile birlikte ortaya çıkan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerdir^{5,6,7,8,9}. Testisteki biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin çoğu; lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA hasarı ve apoptoz ile sonuçlanmaktadır^{6,7}. İskemik dokunun reperfüzyonunda, nitrik oksit (NO-), süperoksit anyon (O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalleri (OH-) gibi toksik reaktif oksijen radikalleri oluşur^{3,5}. I/R; testiste doku hasar mediyatörleri olarak görev alan proenflamatuvar sitokinlerden TNF α ve IL-1 β ' da da artışa sebep olmaktadır⁸.

Hedef proteinleri keserek apoptoza neden olan kaspazlar, apoptozun belirlenmesinde kullanılan önemli moleküllerdir. Kaspaz 2,8,9,10, aktive olarak apoptozu başlatır ve apoptoz kaskadı olan kaspaz 3,6 ve 7'yi devreye sokar. Kaspaz 3, testiküler I/R'da germ hücre apoptozunun belirlenmesinde de kullanılmaktadır¹⁰.

Diyabetes Mellitus (DM) insülin eksikliği, insülin direnci veya her ikisinin birlikteliği sonucu kanda glukoz seviyesinin yükselmesine bağlı olarak gelişen, kronik ve akut komplikasyonlara neden olabilen sistemik bir hastalıktır. Tip 1 ve tip 2 olmak üzere başlıca 2 tipi bulunmaktadır. "İnsüline bağlı diyabet", "juvenil diyabet" ve "çocukluk çağında başlayan diyabet"; tip 1 diyabet olarak bilinmektedir. Tip 1 diyabette, genellikle pankreas beta hücrelerinin otoimmün hasarına bağlı olarak, mutlak insülin eksikliği görülür. İnsüline bağlı olmayan diyabet ise "erişkin diyabet" ,"tip II diyabet" olarak da isimlendirilmektedir. Diyabet rahatsızlıklarının % 90' ından fazlasını tip 2 diyabet oluşturmaktadır. Genetik olarak yatkın kişilerde yaşam tarzı ile tetiklenen ve giderek artan insülin direnci ve zamanla azalan insülin salınımı söz konusudur^{11,12,13,14}. Diyabetli

bireylerde yapılan çalışmalarda diyabetin; spermatojenik hasara, erektil disfonksiyona, sperm hareketliliğinde ve semen hacminde azalmaya sebep olduğu gözlenmiş, erkek fertilitasını direkt ve/veya indirekt olarak önemli derecede etkilediği öne sürülmüştür^{9,15,16}. Ayrıca streptozotosin tarafından indüklenen diyabetli sıçan modeli oluşturulan bir çalışmada MDA seviyesinde artış gözlenirken, SOD, GSH-Px gibi antioksidan enzimler ile testosteron aktivasyonunda önemli ölçüde azalma olduğu rapor edilmiştir¹⁷.

Liraglutid, glukagon-benzeri peptid-1 (GLP-1) agonistidir. İnsan GLP-1 ile sekans özdeşliği yüksek olan liraglutid; Lys26 aminoasidine, glutamik asit ve 16-C serbest yağ asidinin eklenmesi ve 34. aminoasit olan Lys ile Arg aminoasidinin yer değiştirmesi ile GLP-1'den farklılık gösterir¹⁸. Günde bir kez subkutan enjeksiyonundan sonra insandaki yarılanma ömrü 12-13 saattir¹⁹. Liraglutid, büyük peptitler gibi tamamen parçalanarak metabolize edilir²⁰. Klinik çalışmalarda, yetişkin tip 2 diyabet (T2D) hastalarında glikat hemoglobin A1c (Hb A1c) seviyesinin düşürülmesinde liraglutidin etkin olduğu, önemli ölçüde glisemik kontrolü sağladığı ve vücut ağırlığını azaltarak daha az hipoglisemi riski oluşturduğu rapor edilmiştir^{21,22,23,24,25}. Bundan başka liraglutidin, pankreas β hücre fonksiyonunun çeşitli indikatörleri üzerinde de olumlu etkileri bulunmuş ve kardiyovasküler rahatsızlıklarda öncül markerları geliştirdiği gösterilmiştir^{26,27,28}. Ayrıca normal renal fonksiyon veya orta derecedeki böbrek yetmezliği için yapılan regresyon analizlerinde, kreatinin klirensini düşürmediği de ileri sürülmüştür²⁹. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tip 2 diyabet hastalarında glisemik kontrol için liraglutid uygulanmış, ancak insülin kullanan tip 2 diyabet ve böbrek yetmezliği olan bu hastalarda liraglutid kullanımının, β hücre fonksiyonunu ve glisemik kontrolü olumsuz etkilediği öne sürülmüştür. Ancak tip 2 diyabet hastası olmayan sadece böbrek yetmezliği olan hastalarda, postprandiyal serum C-peptidin seçilmesinin yararlı olabileceği ve böylelikle insülinde liraglutid tedavisine geçişin güvenli olabileceği rapor edilmiştir³⁰. Bugüne kadarki bilgilere göre tip 2 diyabet ve böbrek yetmezliği olan hastalarda insülinde liraglutid tedavisine geçişin güvenilir ve başarılı bir şekilde olduğuna dair temel bilgi bulunmamasına karşın, klinik bulgular dikkate alınarak bu geçişin sağlanması önerilmektedir³¹. Böbrek^{31,32}, kalp³³, mide³⁴, bağırsak³⁵,

beyin³⁶, pankreas^{24,37}, over³⁸, karaciğer³⁹ ve adipoz doku⁴⁰ gibi çeşitli organlarda da çalışılan liraglutidin, erkek üreme sistemi üzerine etkisini gösteren literatürde çok az çalışma bulunmaktadır. Klinik ve deneysel çalışmalarda antidiyabetik etkisi yaygın olarak kabul edilen liraglutidin aynı zamanda antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin varlığı da rapor edilmiştir^{33,36}. Bu çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan diyabet ve torsiyon/detorsiyon modelinde testiste liraglutidin antidiyabetik, antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin, ışık ve elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi; spermatogenezin devamı için gerekli olan testosteronu sentezleyen bir çift testis ile genital duktuslar, aksesuar bezler ve penisten oluşur^{41,42,43,44}.

2.1.Testis

Testis, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere iki önemli fonksiyona sahiptir. Hem somatik hücre bölünmesi (mitoz) hem de redüksiyon bölünmesinin (mayoz) gerçekleştiği spermatogenez süreci sonunda erkek gametler oluşmaktadır⁴³. Steriodogenez ise seks hormonları olarak da bilinen başta testosteron olmak üzere androjenlerin sentezlendiği süreçtir. Androjenler; spermatogenezin sürdürülmesinden, erkek embriyonun fenotipik erkek fetus haline gelişiminden ve seksüel dimorfizmden (erkek fiziksel ve davranış karakteristikleri) sorumludur.

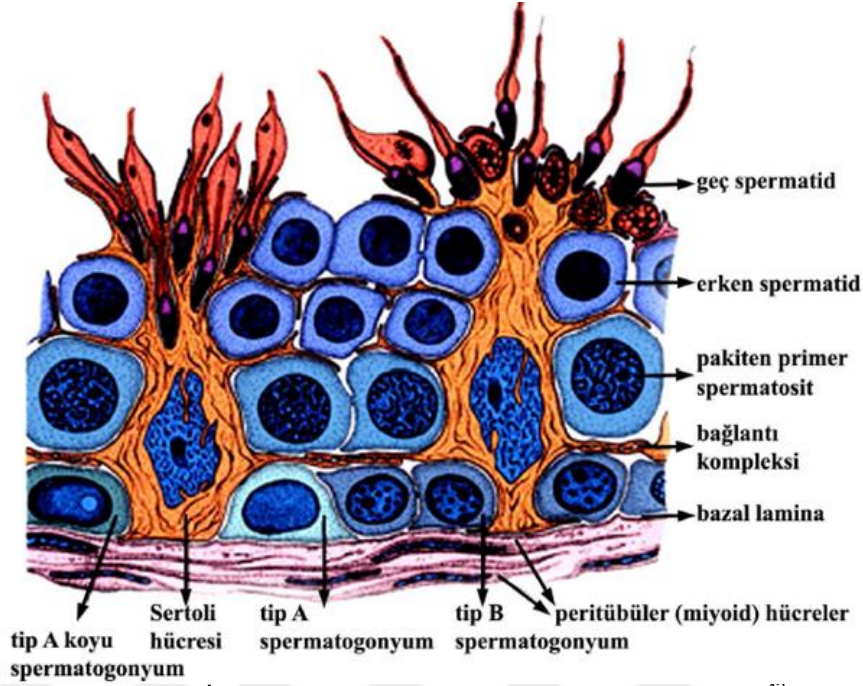
Testis; vücut boşluğu dışında yer alan skrotumun içerisinde uzanan, yaklaşık 20-30 gr ağırlığında, 4-5 cm uzunluğunda, 2,5-3,5 cm genişliğinde, anteroposterior 3 cm çapında, oval şekilli bir çift organdır. Her bir testis anterior abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren ve skrotumun içerisine uzanan uzun bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılıdır. Testisler abdominal kaviteden skrotuma inerken (gebeliğin yaklaşık 26.haftasında) beraberlerinde kan damarlarını, lenf damarlarını, otonomik sinirleri ve testislerin anterolateral yüzeyini kaplayan tunika vajinalis olarak isimlendirilen abdominal periton uzantısını da sürüklerler. Her bir testis, abdominal aortanın bir dalı olan testiküler arter yoluyla kanlanır. Testise yakın bölgede oldukça kıvrıntılı olan testiküler arter, testisten abdominal venlere kanı taşıyan pampiniform venöz pleksus tarafından çevrelenmiştir. Bu düzenleme kan damarları arasında karşılıklı ısı değişimini sağlayarak testislere taşınan kan sıcaklığının düşürülmesine yardım eder. Böylece testisten dönen soğuk venöz kanın zit yönlü akımı sıcaklık değişim mekanizması yoluyla arteriyal kanı testise girmeden önce soğutur. Ayrıca kremaster kasının kontraksiyonu testisleri abdominal duvara yaklaştırırken, gevşemesi ise testisleri skrotum içinde

aşağıya indirir. Düşük sıcaklıklar skrotumun yüzeysel fasiyasındaki ince dartos kasının kontraksiyonuna sebep olur. Dartos kasının kasılması soğukta sıcaklık kaybının düzenlenmesi için skrotumun büzüşmesine neden olur⁴³.

Testis dıştan 3 tabakadan meydana gelen testiküler kapsülle çevrilidir.

1. **Tunika Vaginalis:** Testiküler kapsülün en dış tabakası olup, testisin anterolateral yüzeyini örten, mezotelyal hücrelerden oluşan ve testisin serbestçe hareketine izin veren seröz bir kesedir. Peritondan köken alan iç visseral tabakası testisin ön ve yan yüzeylerini çevreler. Dış pariyetal tabakası ise skrotum üzerine uzanır^{42,43,44}.
2. **Tunika Albuginea:** Düz kas hücrelerini de içeren dens fibroelastik bağ dokusu yapısındaki en kalın tabakadır. Testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur^{41,43,44}.
3. **Tunika Vasküloza:** Testiküler kapsülün zengin kan damarları içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki en iç tabakasıdır.

Kapsülde oluşan kasılmalar testisin hacim değişimlerini düzenler ve duktus sistemine etki ederek spermatozoonların dışarı doğru hareketine yardımcı olur. Testisin posterior yüzeyinde tunika albuginea kalınlaşarak, mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten uzanan bağ dokusu septumları testisi yaklaşık 250-300 lobüle ayırır. Her bir lobül, gevşek bağ doku yapısındaki stroma içerisine gömülü oldukça kıvrıntılı 1-4 adet seminiferöz tübül içerir. Stromada tübüller arasında yer alan interstisyum; kan damarları, lenfatik damarlar, makrofajlar ve steroid hormon sentezleyen Leydig (interstisyel) hücrelerini içerir. Ayrıca mediastinum testis kan damarları, lenf damarları ve genital duktusların da girip çıktığı bölgedir.



Şekil 2. İnsan seminiferöz tübül epitelinin şematik çizimi⁴³.

Seminiferöz tübüller dıştan bağ dokusu yapısındaki peritübüler doku ya da membrana propria ile sarılıdır.

Membrana propria 4 tabakadan oluşmuştur:

İç hücresel olmayan tabaka: Kollajen lifler, glikoproteinler ve hyaluronik asit içermektedir. 2 tabakadan oluşur.

- Glikoprotein yapısında PAS(+) bazal lamina
- Bol miktarda kollajen liflerle karakterize açık saha

İç hücresel tabaka: Küçük, ince ve uzun şekilli miyoid hücrelerden oluşur. Çekirdek ince ve uzundur. Sitoplazmaları bol miktarda granüler endoplazmik retikulum (GER), mikropinositotik veziküller ve lipid damlacıklarının yanı sıra bol miktarda aktin filamanları da içerir. Bu yüzden düz kas hücrelerine benzerler.

Miyoid hücre tabakası kemiricilerde tek tabaka iken insanlar ve bazı alçak vertebralılarda 3-5 tabakadan oluşur. Miyoid hücrelerin ritmik kasılmalarıyla oluşan peristaltik hareketler sperm ve testiküler sıvının seminiferöz tübüllerden hareketini kolaylaştırır.

Dış hücresel olmayan tabaka: Kalınlığı iç hücresel olmayan tabakanın bir laminası kadar olan, glikoprotein yapısında PAS(+) en dıştaki bazal laminadır.

Dış hücresel tabaka: Fibroblastlardan meydana gelmiştir.

Membrana propria kalınlığı yaş, çeşitli genetik ve toksik ajanlara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir⁴³.

2.3.Sertoli Hücreleri

Sustentaküler hücreler ya da destek hücreleri olarak da adlandırılan Sertoli hücreleri puberteden sonra mitotik aktivite göstermezler. Bazalden lümeneye kadar uzanan prizmatik hücreler olup, komşu spermatojenik hücreleri çevreleyen apikal ve lateral uzantılara sahiptir. Her bir Sertoli hücresi yaklaşık 30-50 germ hücresine desteklik vermektedir⁴. Elektron mikroskopik olarak derin invaginasyonlarla karakterize, 1-2 adet çekirdekçik içeren, oval veya üçgen şekilli büyük bir çekirdeğe sahiptir^{43,44}. Sitoplazma yaygın agranüler endoplazmik retikulum (SER), gelişmiş granüler endoplazmik retikulum (GER) ve annulate lamellae, yaygın Golgi kompleksi, mikrotübüller, lipid damlacıkları, salgı vezikülleri, glikojen granülleri, filamanlar, lizozomlar ve tübüler tipte şekil değiştirebilen mitokondriyonlar içerir. Ayrıca SER ile yakın ilişkide fincan şekilli mitokondriyon ve SER ile ağzlaşan protrüzyon mitokondriyonları olmak üzere 2 özel tip mitokondriyon da tanımlanmıştır. İnsanlarda bazal sitoplazmada karakteristik inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher kristalleri) bulunur. Histolojik preparatlarda 10-25 µm uzunluğunda 1 µm genişliğinde gözlenen fusiform şekilli bu kristaller transmisyon elektron mikroskopunda paralel veya birleşmiş demetler halinde 15 nm çapında filamentler olarak gözlenir. Kimyasal kompozisyon ve fonksiyonu bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda bu kristallerde lipoprotein reseptör proteini (CLA-1) birikimi saptanmıştır. Bu bulgular, inklüzyon cisimciklerinin lipid transportu ve Sertoli hücreleri tarafından kullanımıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Sertoli hücreleri hem birbirleriyle hem de spermatojenik hücreler ile bağlantılar içerir. Sertoli hücresi-Sertoli hücresi arasındaki sıkı bağlantılar ve sitoplazmik özelleşmeler kan testis

bariyerini oluşturur. Bu bariyer seminiferöz tübül epitelini bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki bölgeye ayırır. Bariyer apikal kompartmanındaki spermatojenik hücreleri (spermatosit, spermatid) otoimmün reaksiyon ve toksik bileşenlerden koruma görevi yapar. Sertoli hücrelerinin diğer özelleşmiş bağlantı tipleri ise geçit bağlantıları (gap junctionlar), Sertoli hücreleri ile erken spermatojenik hücrelerinin arasındaki desmozom benzeri bağlantılar ve bazalde ise hemidesmozomlardır^{41,43,44}.

Sertoli hücrelerinin görevleri:

1. Spermatojenik hücreleri besler, korur ve destekler^{41,43,44}.
2. Spermiyasyon sırasında aktin aracılı kontraksiyonlarla spermatidlerin seminiferöz tübül lümenine salınımını kolaylaştırır⁴³.
3. Protein ve iyondan zengin sıvı sekresyonu yapar^{41,42}.
4. Folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarısıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler^{41,43,44}.
5. Spermiyogenez süresince oluşan rezidüel cisimcikleri fagosite eder^{41,42,44}.
6. Anterior hipofizden salınan FSH inhibisyonunu sağlayan inhibini sentezler^{41,42,43,44}.
7. Stem hücre faktörü (SCF), glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF), müllerian inhibe edici faktör (MIF) gibi glikoprotein yapısında büyüme veya parakrin faktörler sentezler^{43,44}.
8. Plazminojeni, aktif proteolitik plazmine dönüştüren plazminojen aktivatör, transferrin(demir taşıyıcı protein) ve seruloplazmin (bakır taşıyıcı protein) sentezler⁴³.

2.4. Spermatojenik Hücreler

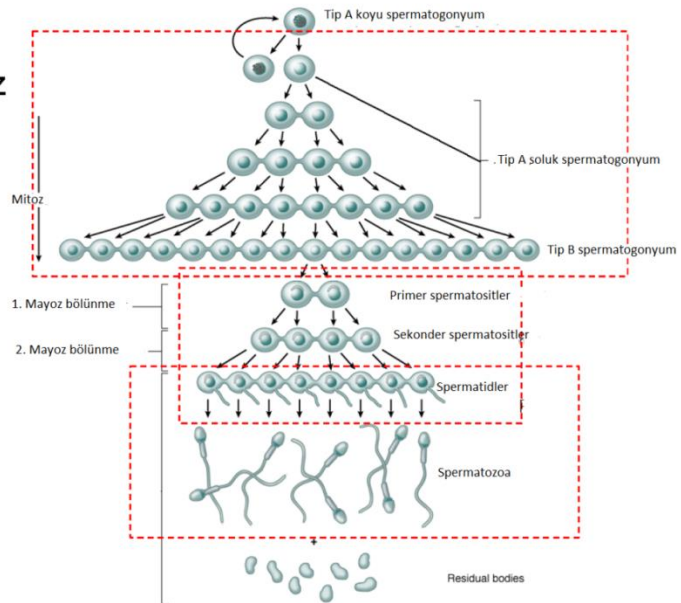
Puberte ile birlikte düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişim evresinde yolk kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Spermatojenik hücreler spermatogenez süresince komşu Sertoli hücreleri arasında bazalden lümenine doğru ilerleyerek gelişim gösterirler. Seminiferöz tübülün çok katlı epitelini oluşturan 4-8 hücre sırası

şeklindeki germ ya da spermatogjenik hücreler 4 tiptir⁴³. Bu hücre tipleri;

1. Spermatogonyumlar
 - A) Tip A koyu spermatogonyumlar
 - B) Tip A açık spermatogonyumlar
 - C) Tip B spermatogonyumlar
2. Spermatisitler
 - A) Primer spermatisit
 - B) Sekonder spermatisit
3. Spermatisidler
 - A) Golgi evresi
 - B) Şapka evresi
 - C) Akrozomal evresi
 - D) Maturasyon evresi
4. Spermatozoon

Spermatogonyumların spermi oluşturma süreci olarak bilinen ve 64-72 gün süren spermatogenezis, spermatogonyal faz (proliferasyon), spermatisit fazı (mayoz), spermatisit fazı (spermiogenezis) olmak üzere 3 fazdan oluşur^{41,43,47}.

- 1- Spermatogonyal faz (Mitoz)
- 2- Spermatisit fazı (Mayoz)
- 3- Spermatisit fazı (Spermiogenezis)



Şekil 3. Spermatogjenik hücre serisinin şematik gösterimi³

2.4.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyal fazda spermatogonyumlar, yetişkin yaşamı boyunca testiste germ hücre popülasyonunun yenilenmesi ve varlığı için çoğalan diploid sayıda kromozoma sahip olan, bazal lamina üzerine yerleşmiş hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların altında yerleştikleri için kan-testis bariyeri dışında kalırlar. Spermatogonyal stem hücrelerin replikasyonu sonucu meydana gelirler. Bu hücrelerde mitotik aktivite testosteron hormonuyla indüklenir. Yaklaşık olarak 12 µm çapında, soluk boyanan kromatin içeren çekirdeğe sahiptir. Histolojik preparatlarda çekirdek görünümleri esas alınarak 3 grupta incelenir^{41,43}.

- 1. Tip A koyu (Ad) spermatogonyum:** Stem hücre olduğu düşünülen bu hücreler düzensiz aralıklarla bölünerek tip A koyu ya da tip A açık hücreleri meydana getirirler. Devamlı geçirdikleri mitotik bölünmelerle sayılarını artırarak spermatogonyal kök hücre popülasyonunu da korurlar. Oldukça bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdeğe sahiptir^{41,43,44}.
- 2. Tip A açık (Ap) spermatogonyum:** Açık renkte boyanan ince granüllü kromatinli oval çekirdeğe sahiptir. Ardışık birkaç bölünme geçirerek sayılarını artırır^{41,43,44}.
- 3. Tip B spermatogonyum:** Tip A açık spermatogonyumların bir seri mitotik aktivitesi sonucu farklı sferikal şekilli çekirdeğe sahip hücrelerdir. Çekirdek merkezi yerleşimli belirgin çekirdekçikle karakterizedir⁴³.

2.4.2. Spermatozoidler

Spermatozoid fazında Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu seminiferöz tübülün en büyük hücresi olan, sferikal şekilli primer spermatozoidler oluşur. Bu hücreler mayoz bölünme geçirerek hem DNA miktarlarını hem de kromozom sayılarını azaltırlar⁴³.

İnsanda her bir primer spermatozoid yaklaşık 22 gün süren profaz evresinin leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez fazlarına girerler.

Leptotende; her kromozom birbirine paralel iki kromatidden oluşmuştur⁴⁶. İki kardeş kromatidden oluşan homolog kromozomlar çekirdek kılıfının iç membranına tutunur^{43,48}. Zigoten evresinde homolog kromozomların eşleşmesi, sinaps oluşumu ve kromatin kalınlaşması gerçekleşir. Pakiten evresinde, sinaptonemal kompleks tarafından homolog kromozomların bir araya gelmesiyle sinaps tamamlanır. Paternal ve maternal DNA'nın homolog kısımları birbirleriyle karşı karşıya gelir ve kardeş olmayan kromatidler arasında gen değişimi yani crossing-over başlar. Bu süreç genetik çeşitliliği garantilemektedir. Rekombinasyonun gerçekleştiği ve hücrelerin hızlı bir şekilde büyüme gösterdiği pakiten fazı, memelilerde yaklaşık bir haftada tamamlanır. Diploten evresinde, sinaptonemal kompleks dağılmaya başlar ve iki homolog kromozom birbirinden ayrılır, sadece kiazma denilen uç bölgelerde yapışık kalırlar. Diyakinez evresinde, kinetokorlar birbirinden uzaklaşır ve kromozomlar sadece kromatidlerin uç noktalarından birleşik olarak kalırlar. Kromozomlar çekirdek zarından ayrılırlar, kısalırlar ve kalınlıkları artar. Sinaptonemal kompleks dağıldığı halde kısa bir parçası kiazma bölgesinde kalır. Bu uzamış profaz safhasının sonunda oluşan kardeş kromatidler metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçerek her biri birbirine sitoplazmik köprülerle bağlı olan haploid kromozumlu sekonder spermatozoidleri oluşturur⁴³.

Birinci mayoz bölünmeyle oluşan hücreler sekonder spermatozoid adını almaktadır. Bu hücreler yeni DNA sentezlenmesi olmadan ikinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Oluşacak spermatidler $22+X$ veya $22+Y$ (n sayıda) kromozoma sahiptir. İkinci mayoz bölünmenin metafazında kromozomlar metafaz plağına dizilirler. Kardeş kromatidler ayrılıp mekiğin zıt kutuplarına çekilir. İkinci mayoz bölünme sonunda nDNA ve kromozom sayısına sahip, sitoplazmik köprülerle bağlı spermatidler oluşur⁴³.

2.4.3. Spermatozoidler

Spermatozoidler, olgun sperme farklılaşırken yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye başlarlar. İkinci mayoz bölünmenin sonucunda oluşan 4 adet haploid spermatozoidin her biri nDNA ve $22+X$ veya $22+Y$ kromozomuna sahiptir. Bu aşamadan sonra bölünme geçirmezler, farklılaşarak haploid kromozumlu

olgun spermi oluřtururlar⁴³.

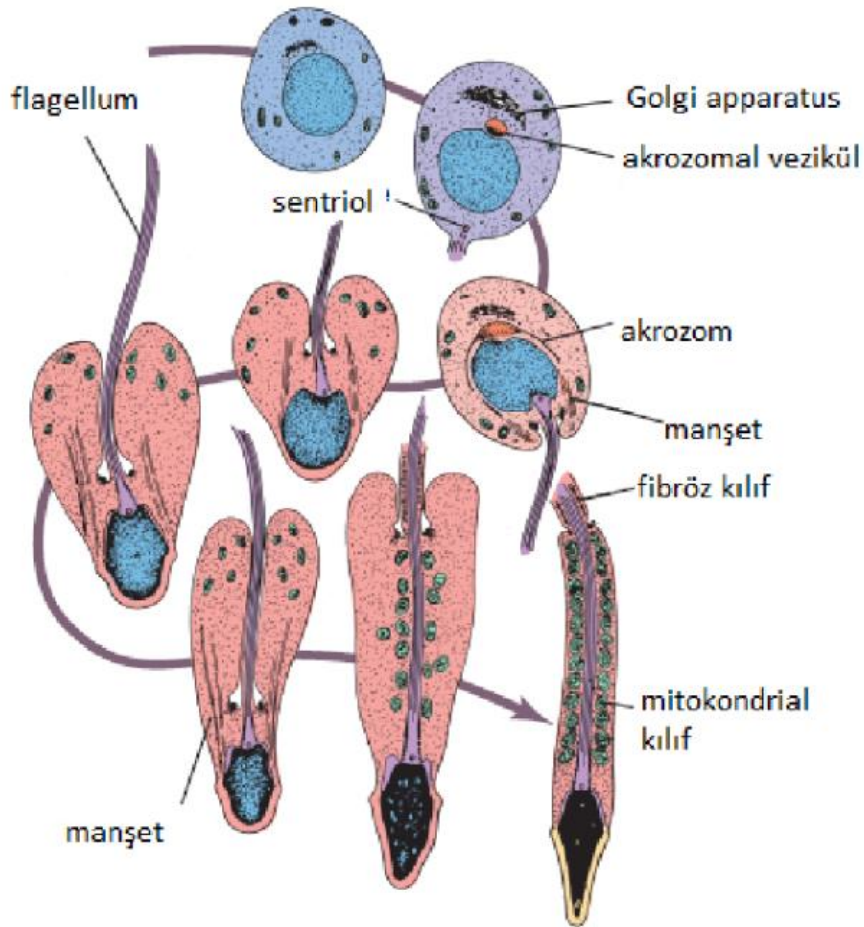
Spermatidlerin olgun sperme farklılanması spermiyogenez süreci spermiyogenez olarak adlandırılır ve bu süreç 4 fazdan oluşmaktadır. Bu fazlar oluşurken spermatidler Sertoli hücre kriptalarına özel bağlantılarla tutunmuş haldedirler⁴³.

- 1) Golgi fazı
- 2) şapka fazı
- 3) Akrozom fazı
- 4) Maturasyon fazı

1. **Golgi fazı:** Bu evrede yuvarlak şekilli spermatidler zengin organelle sahiptir. Sitoplazma çekirdeğe yakın yerleşimli Golgi kompleksi, kristal mitokondriyonlar, bir çift sentriol, serbest ribozomlar ve SER túbülleri içerir. Endoplazmik retikülümde yapılan hidrolitik enzimler Golgi kompleksine iletilir, çeşitli değişiklikler geçirir ve "proakrozomal granül" adı verilen PAS(+) granüller halinde salınırlar. Bu granüller akrozomal vezikülleri oluşturmak üzere birleşir, spermin ön kutbunu belirleyecek şekilde çekirdek zarına tutunur. Sentriollerden bir tanesi çekirdek bölgesinden uzaklaşır, flagellumun aksonemini (9 çift periferde, 2 tane merkezde mikrotübül yapısı içeren, kuyruk iskeleti) oluşturmak üzere akrozomal bölgenin zıt kutbuna yerleşir^{41,42,43,44}.
2. **şapka fazı:** Akrozomal vezikül, çekirdeğin yarısını örtecek şekilde genişleyerek sperm başını şapka gibi sarar. Vezikül içeriği hidrolitik enzimleri içeren " akrozom " adını alır. Bu fazda şapka altında bulunan çekirdek kılıfı porlarını yitirerek daha kalın hale gelir. Aynı zamanda çekirdekte de kromatin yoğunlaşması gözlenir^{41,42,43}.
3. **Akrozom fazı:** Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom; hyaluronidaz, akrozin, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimleri içerir. Fertilizasyonda hyaluronidaz kumulus ooforus tabakasının, akrozin ve tripsin benzeri proteazlar ise zona pellusidanın aşınmasını sağlar. Kromatini yoğunlaşan çekirdeğin,

distalindeki sentriolden çıkan mikrotübüller, flagellumu şekillendiren aksonemi oluştururken mitokondriyonlar ise flagellum proksimal parçasını çevreleyerek spermatozoonun hareketliliğini sağlayan sperm orta parçasını oluştururlar⁴³.

4. **Olgunlaşma (maturasyon) fazı:** Bu son evrede spermatidlerin arasındaki sitoplazmik köprüler ortadan kalkar. Oluşan “artık cisimcik” Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Olgunlaşma fazının sonuna doğru spermatozoonlar tübül lümenine salınırlar. Bu karmaşık sürece spermiyasyon adı verilir. Sertoli hücresi-spermatid bağlantılarında β 1-integrinlerin yer alması ve spermiyasyon sırasında integrin bağlı kinazların aktivasyonundaki artış, spermatidlerin salınmasında enzimatik bir kontrol olduğunu düşündürmektedir^{41,42,43}.

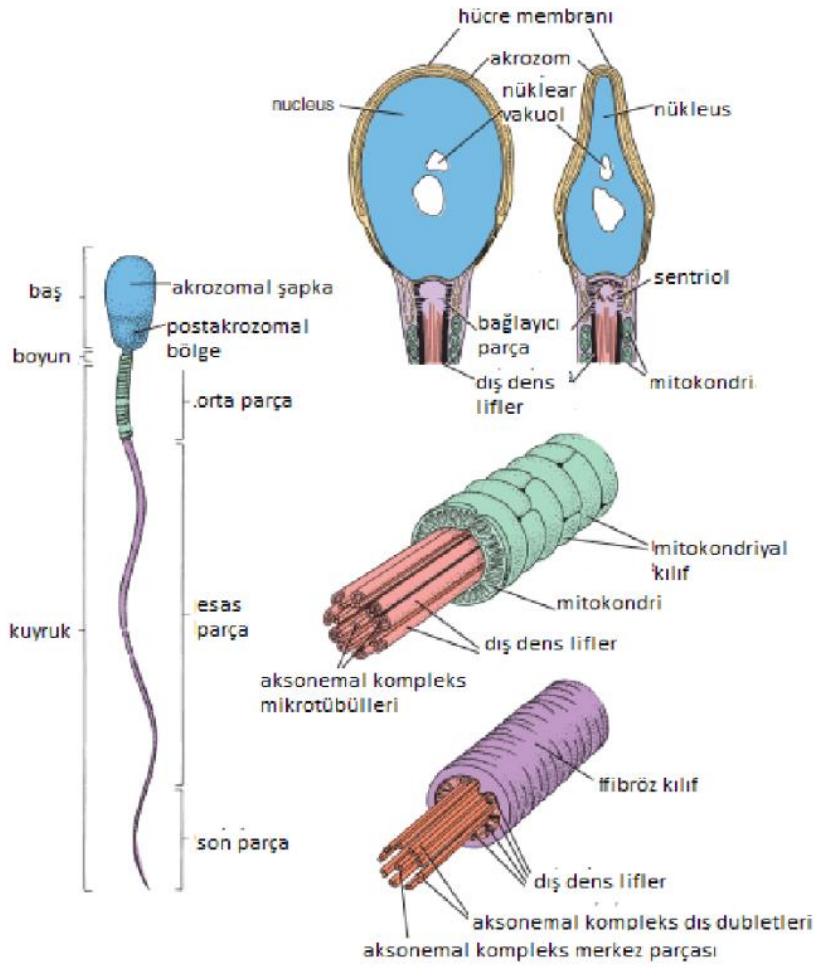


Şekil 4. Spermiyogenezisin şematik gösterimi⁴³.

2.4.4. Spermatozoon

Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminiferöz tübül lümenine geçen spermatozoonlar morfolojik olarak olgun olmasına rağmen fonksiyonel olarak henüz olgun değildir. Duktus epididimiste hareket yeteneklerini, dışı genital kanallarında ise geçirdikleri kapasitasyon süreci ile dölleme yeteneklerini kazanarak olgun sperm haline gelirler. Baş, boyun, kuyruk olmak üzere 3 parçadan oluşan olgun insan spermi yaklaşık olarak 60 µm uzunluğundadır.

Yassı şekilli sperm başı 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. Anterior yüzeyi yarıya kadar akrozomla sarılıdır. Baş bölgesini kuyruk bölgesine bağlayan bir çift sentriolün bulunduğu boyun bölgesinden başlayan aksonem, kuyruk boyunca uzanır özellikle boyun bölgesi çok sayıda mitokondriyon ile çevrilidir. Boyun bölgesinin son kısmında spermin hareketinde rol alan "annulus" adı verilen bir kalınlaşma yer alır. Spermin en uzun parçası olan kuyruk yapısal olarak silyuma benzer ve 3 parçadan oluşmuştur: Orta parça, esas parça, son parça. Sarmal dizilmiş miyokondriyonların oluşturduğu orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğundadır. 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundan başlayıp kuyruk boyunca uzanan dokuz adet uzunlamasına seyreden filamandan oluşur. Esas parça kuyruğun en uzun kısmıdır. 40 µm uzunluğunda olup, kalın fibrilleri ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içerir. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan keratin proteinlerini içerir. Kuyruğun 5 µm'lik en kısa parçası olan son parça ise dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın olmaması nedeniyle çıplaktır. Sadece aksonem içerir⁴³.



Şekil 5. Spermatozoon şematik çizimi⁴³.

2.5. İnterstisyum ve Leydig Hücreleri

Seminiferöz tübüller arasında yer alan interstisyum; Leydig (interstisyel) hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, undifferensiyel mezenşimal hücreleri, sinir lifleri, kan ve lenfatik damarları içerir^{42,44}. Leydig hücreleri, gruplar halinde interstisyuma yerleşen, yuvarlak veya poligonol şekilli, eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. İnce yapısal olarak dağınık, yoğun kromatinli oval şekilli çekirdeğe ve 1-2 çekirdekçiğe sahiptir. Sitoplazmaları yaygın agranüler endoplazmik retikulum (SER), küçük lipid damlacıkları, tübüler kristalli mitokondriyonlar, lipofuksin granülleri ile Reinke kristali ve prekürsörlerini içerir. Histolojik preparatlarda bu kristaller yaklaşık olarak 3x20 µm boyutlarında olup refraktildirler. Hücrenin bir protein ürünü oldukları düşünülüp, kesin yapı ve fonksiyonları bilinmemektedir. Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin

gelişiminden sorumlu testosteron hormonunu sentezler^{41,42,43}.

2.6. Kan Testis Bariyeri

Komşu Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi sıkı bağlantılar seminiferöz tübüller ile interstisyel kan damarları arasında geçirgen bir bariyer oluşturur. Kan-testis bariyeri olarak adlandırılan bu bariyer, kandan gelen zararlı ajanlardan germ hücrelerinin korunmasını, seminiferöz tübüllerin sıvı içeriğinin kan plazmasından ve testiküler lenfden farklı olmasını sağlar. İmmunolojik gelişim seksüel olgunlaşmadan önce meydana gelir. Bu nedenle sperme özgü proteinler, gelişen spermlerin yabancı olarak algılamasına neden olur. Bu yüzden germ hücrelerinin ölümüne sebep olacak immün yanıt oluşabilir. Ancak kan-testis bariyeri gelişen spermler ile immün yanıt arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırmak için, seminiferöz tübüllere immünooglobulinlerin geçişini önler.

Önemli fonksiyona sahip olan kan testis bariyeri seminiferöz tübülü bazal ve apikal (adluminal) kompartman olmak üzere iki bölgeye ayırır. Erken primer spermatositler ve spermatogonyumlar bazal bölgede bulunurken, daha olgun spermatositler ve spermatidler apikal bölgede yer alır. B tipi spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle oluşan erken spermatositlerin, bazal bölgeden luminal bölgeye iletilebilmesi için bağlantı kompleksinden geçmesi gereklidir. Spermatogenez sırasında bu bağlantı kompleksleri moleküler sinyal yollarıyla açılır ve gelişen spermatojenik hücrelerin apikal kompartmana geçişinden sonra kan testis bariyerini oluşturan bağlantı kompleksleri yeniden düzenlenir^{43,49}.

2.7. Liraglutid

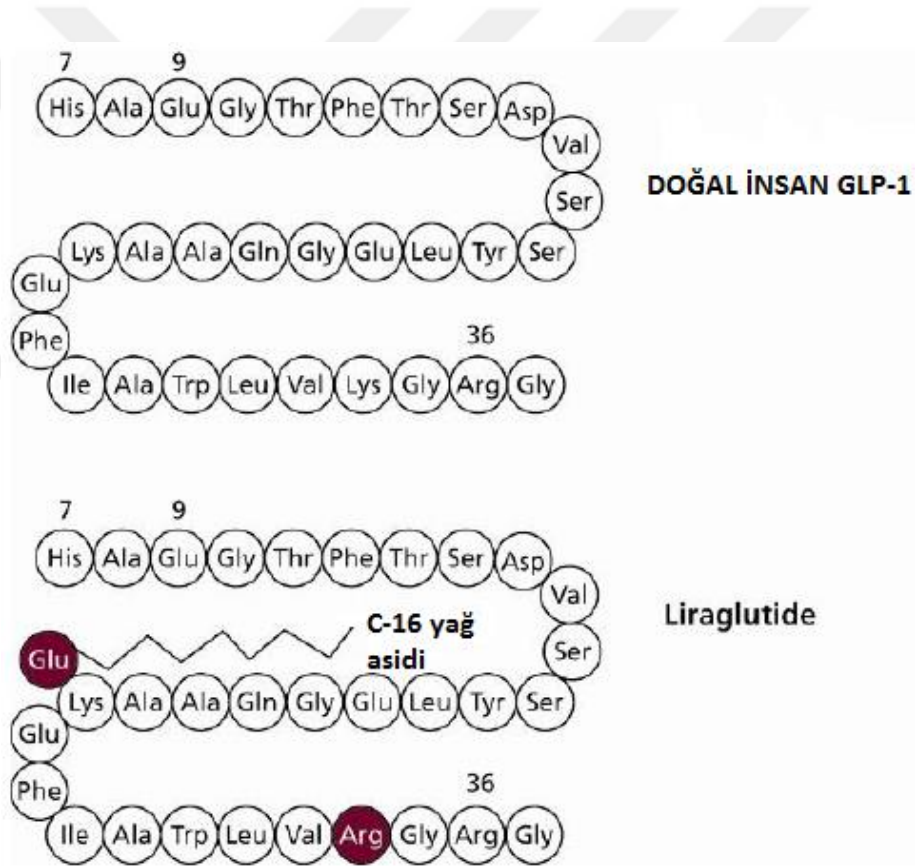
Bağırsaktan besin alımı sonucu salgılanan hormonlar, inkretin hormonlar olarak adlandırılmaktadır. İnkretin hormonlar; glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insülinotropik peptit (GIP) olmak üzere iki tiptir. GLP-1, ileum ve kolonda yer alan L hücreleri tarafından, GIP ise bağırsağın daha üst bölgelerinde yerleşmiş olan K hücreleri tarafından salgılanır. Bu hormonlar pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanmasını arttırmaktadır. GLP-1

agonistleri olan Eksenatid ve Liraglutid kilo aldırmayan, hipoglisemi yapmayan ve hayvan deneylerinde beta hücre kütlesi ve ömrü üzerindeki olumlu etkileri ispatlanan, erken dönem diyabet tedavilerinde kullanılan ilaçlar arasındadır⁵⁰. Liraglutid; rekombinat DNA teknolojisiyle üretilen açillenmiş GLP-1 analogudur. 34. aminoasit olan lizinin arginin ile yer değiştirmesi ve 26. aminoasit olan lizine palmitik yağ asit zincirinin eklenmesi ile oluşturulur (Şekil 6). Lipid yan zinciri aracılığı ile serum albuminine non kovalent olarak bağlanarak modifiye edilmiştir. Bunun sonucu daha yavaş yıkıma uğrar⁵¹. GLP-1 ile %97 homoloji gösterir. Doğal GLP-1'in yarı ömrü yaklaşık 1.5-2.0 dakikadır⁵¹. Liraglutid, molekül özelliği nedeniyle albumine daha sıkı bağlanır ve böylece dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) aktivitesine daha dirençlidir. Bu yüzden yarılanma ömrü daha uzun olup yaklaşık 12-13 saattir ve günde tek doz uygulanabilir. GLP-1 reseptörüne bağlanarak hücre membran yüzeyinde reseptör G-proteini ile kompleks oluşturur. Böylece hücre içi kaskad aktive olur ve bu da siklik adenosin monofosfatın (cAMP) artışına neden olur. Liraglutid, pankreas beta ve alfa hücrelerinin salgılama fonksiyonlarını etkiler. En önemli etkisi hiperglisemiye karşı, kan glukoz konsantrasyonunu düşürmesi ve insülin hormonunu glikoz bağımlı olarak uyarmaktır. Ayrıca pankreatik alfa hücrelerinden salgılanan glukagonu düşürmek ve sonuç olarak hepatik glukoz üretimini sağlamaktır. Yapılan çalışmalarda liraglutidin, hem çoğalmayı uyarıp hem de apoptozu inhibe ederek beta hücre kitlesini ve işlevini arttırabildiği gösterilmiştir^{18,52}. Ayrıca liraglutid, merkezi sinir sisteminde GLP-1 reseptörüne bağlanarak tokluk hissini de arttırır. Amiloid protein P-presenilin 1 farelerde yapılan çalışmalarda uzun süreli sinaptik iletimi ve bilişsel fonksiyonu geliştirdiği, amiloid plak birikimini azalttığı rapor edilmiş ve Alzheimer hastalığının erken safhalarında olası önleyici etkinin sağlanması için liraglutidin kullanılması önerilmiştir⁵³. Ayrıca liraglutid, klinik olarak anlamlı kilo kaybı sağlamanın yanında, miyokardiyal ve endotelial fonksiyonlar ile lipid ve kan basıncı profillerini de düzenlemektedir^{54,55,56}.

Deri altı enjeksiyonundan sonra enjeksiyon alanındaki yağ asidi yan zincirleri liraglutidin heptamerler oluşturmasına izin verir. Heptamerlerin boyutu ve kendi aralarındaki kuvvetli bağlanmaları kan dolaşımındaki emilimi

yavaşlatır. Sonuç olarak, liraglutid, yavaş yavaş emilerek, deri altı enjeksiyonundan 8-12 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır⁵⁷.

Liraglutid, tip 2 diyabetik hastalarda oral ajanlarla kombinasyonda, diyet ve egzersizle birlikte kullanılabilir. Profil kalemlerle uygulanan liraglutidin başlangıç dozu 0,6 mg'dır. Bir hafta için günde bir kez subkutanöz uygulanır, (GİS yan etkileri azaltmak için) bir hafta sonra doz 1,2 mg artırılabilir. Eğer kan şekeri hedef değerlerin üzerinde kalıyorsa günlük 1,8 mg'a kadar doz artırılabilir²⁴.



Şekil 6. İnsan GLP-1 ve liraglutidin aminoasid yapısı⁵⁸.

2.8. Testiküler İskemi Ve Reperfüzyon

Testis; hipertermi, radyasyon, inflamasyon, iskemi ve germ hücre apoptozunu indükleyen ajanlar gibi çeşitli stres etkenlerine karşı hassastır⁵⁹.

Testiküler torsiyon, neonatal ve ergenlik döneminde sıklıkla görülen ürolojik bir durumdur^{60,61}. Pubertal dönemde görülen vakaların %65'i özellikle 13 yaş civarındadır^{60,62,7} ve geç tanı kısırlığa ve testiküler fonksiyonel bozukluklarına yol açabilir⁶⁰. Testiküler torsiyondaki temel patoloji; torsiyonu takiben ROS artışına bağlı olarak oluşan doku hasarı ile ortaya çıkan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerdir^{3,4,5,7}. Testiküler torsiyon, lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA hasarı ve apoptoz gibi birçok biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere neden olabilmektedir^{6,7}.

İskemik dokularda canlılığı korumak için kısa sürede reperfüzyonun sağlanması gereklidir. Bu nedenle testiküler torsiyonlu olgularda zaman geçirilmeden müdahale edilmesi önerilmiştir. Ancak iskemi ortadan kaldırmak için uygulanan reperfüzyonda dokularda kan akımının tekrar başlamasıyla morfolojik düzelmeye beklenirken, doku hasarının şaşırtıcı şekilde daha fazla olduğu rapor edilmiştir⁶³. Reperfüzyon hasarının; nötrofil infiltrasyonu ve ROS artışıyla yakından ilişkili olduğu, mitokondriyon ve hücre membran geçirgenliğinde artışa, protein denatürasyonuna ve hücre hasarına yol açtığı belirtilmiştir^{31,64}.

Parankimal hücrelere karşı reperfüzyonun olumsuz etkileri evrensel olarak kabul edilmemesine karşın mikrovasküler yapıların, özellikle mikroskopik kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerinin, I/R'na daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir⁶⁵. I/R hasarının patogenezinde mikrovasküler disfonksiyonun altında yatan mekanizmalar ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır⁶⁶. Reperfüzyonda gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla artan ROS seviyesi başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en duyarlı hücresel yapılar; zar lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir^{66,67}.

2.8.1. Torsiyonun Fertilite Üzerine Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı çok duyarlı olan testisler, oksidatif stres varlığında ciddi şekilde hasar gördüğünden, germ hücrelerinde ölümler gözlenir³. Torsiyon oksidatif stresi tetikler ve germ hücrelerinde nekroza sebep olur. Bu da ileri dönemlerde infertiliteye neden olabilir⁶².

Yapılan çalışmalarda torsiyon öyküsü olan erkeklerin %36'sının sperm sayısının <20 milyon/ml'nin altında olduğu rapor edilmiştir⁶⁸. Bir diğer çalışmada ise erken dönemde (<13 saat) detorsiyon yapılmasının fertilitiyi koruduğu, geç dönemde (ortalama 70 saat) ise olumsuz etkilediği öne sürülmüştür⁶⁹.

2.8.2. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı

İskemi; dokunun oksijen (O₂) ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin karşılanamaması ve artık ürünlerin uzaklaştırılmaması olarak tanımlanmaktadır⁷⁰. İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. Bunun sonucunda hücresel enerji depoları boşalır ve toksik metabolitlerin birikmesiyle hücre ölümleri görülür⁷¹. I/R hasarı karakteristik olarak ROS'nin ortaya çıkmasına⁷², sitokinlerin salınımında artışa⁷³ ve PMNL (polimorfonükleer lökositler)'in aktivasyonuna⁷¹ sebep olur. İskeminin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması ve biriken toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için gereken yeniden kanlanma (reperfüzyon) olayı ise iskeminin yaptığından çok daha şiddetli bir hasara yol açmaktadır³¹.

2.8.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisinde Rol Oynayan Etkenler

Serbest oksijen radikalleri; bir ya da daha çok sayıda çift oluşturmamış elektron içeren atom ya da atom gruplarıdır⁷⁴. Kan akımının düzenlenmesiyle büyük miktarlarda ROS üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir^{31,66}. ROS ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar ve bir serbest radikalın, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girmesi, binlerce reaksiyondan oluşan zincirlerinin oluşumunu başlatır. Serbest oksijen radikallerinin paylaşılmayan elektronlarından dolayı protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarı ortaya çıkar⁷⁴.

İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelir. İskemi reperfüzyon hasarındaki nötrofiller, bu bölgede ROS üretirler ve ortaya çıkan ROS antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınır ve hasar gerçekleşir. Nötrofiller de uyarılmaları sonucunda esnek yapılarını kaybederek

mikrosirkülasyonda kalır ve embolizasyona neden olurlar⁶⁶. Ayrıca endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının neden olduğu bası sonucu kapiller damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar³¹.

2.9. Diyabetes Mellitus

Diyabet Mellitus (DM) insülin eksikliği, insülin direnci veya her ikisinin birlikteliği sonucu kanda glukoz seviyesinin yükselmesine bağlı olarak gelişen, akut ve kronik komplikasyonlara neden olabilen sistemik bir hastalıktır^{12,13}. Hiperglisemi, dislipidemi, glukozüri ve bunlara eşlik eden birçok klinik ve biyokimyasal bulgu ile seyreden DM'nin en önemli patolojisi, insülin eksikliğine bağlı olarak hücrelerin glukozdan yararlanamaması ve kan glukoz düzeyinin yükselmesidir (hiperglisemi). Ayrıca, damar çeperlerinde lipid birikimi ile ateroskleroz gelişimi, doku proteinlerinin azalması ve yağ mobilizasyonun artması da diyabetin genel bulguları arasındadır⁷⁵. DM'de hiperglisemi kontrol altına alınamazsa zaman içinde diyabetin kronik komplikasyonları olan retinopati, nefropati, periferik ve otonom nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar görülür. Diyabet hastalığının kliniğinde sıklıkla görülen belirtiler; ağız kuruluğu, bol su içme, sık idrara çıkma, açlık hissinin fazla olması ve çok yemek yemendir. İnsülin yetersizliğinden dolayı hücrelere yeterli glikoz giremediği için açlık hissi oluşmaktadır. İnsülinin yokluğunda veya eksikliğinde alınan besin enerjiye dönüşemediğinden açlık hissi devam eder. Ayrıca hücrelerdeki enerji yetersizliği hücre fonksiyonlarında yavaşlamaya yol açtığından, vücut direncinde düşme, zayıflama, bulanık görme, ciltteki yara ve kesiklerin geç iyileşmesi gibi belirtiler de görülmektedir⁷⁶.

DM; akut metabolik komplikasyonların yanı sıra, uzun dönemde vasküler, böbrek, retinal ya da nöropatik bozukluklara yol açan, morbitide ve erken mortalite riski yüksek bir hastalıktır⁷⁷. DM etiyojisine bağlı olarak, insülin sekresyonunda azalma, glukoz yapımında artma ve plazma glukoz kullanımında azalma gibi faktörler hiperglisemiye katkıda bulunmaktadır⁷⁶. Diyabetin etiyojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasıyla, hastalığın

sınıflandırılması da sürekli değişime uğramaktadır. DM'nin tüm tiplerinde temel özellik hiperglisemi olmakla birlikte, hiperglisemiye neden olan fizyopatolojik mekanizmalar değişiklik gösterir^{76,77}. Diyabet, ayrıca koroner kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik damar hastalıkları gibi makrovasküler bozuklukların daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına ve daha şiddetli görülmesine de neden olabilmektedir⁷⁷.

2.9.1. Diyabetes Mellitus Tipleri

Diyabet; tip 1, tip 2, spesifik nedenlere bağlı diyabet ve gebelik diyabeti (gestasyonel diyabetes mellitus) olmak üzere başlıca dört gruba ayrılır. Diyabetli hastaların çoğunluğunu tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalar oluşturmaktadır. Hem tip 1 ve hem de tip 2 diyabette metabolik kontrolün sağlanması ile bu komplikasyonların önlenilebileceği veya geciktirilebileceği kanıtlanmıştır^{12,13}. Tip 1 diyabet, "İnsüline bağlı diyabet", "juvenil diyabet", "çocukluk çağında başlayan diyabet" olarak da adlandırılır. Tip 1 diyabette, pankreas beta hücrelerinin otoimmün hasarına bağlı olarak mutlak insülin eksikliği görülür. Beta hücre yıkımı (T lenfositlerin aktivasyonu ile), insülin sekresyonunun yokluğu ya da çok düşük oluşu, glukagon gibi uyarılara C-peptid yanıtının alınamayışı genellikle tam insülin yetmezliğine yol açar. 11-13 yaşlar gibi erken yaşlarda başlar ve hastalar kısa sürede hızla kilo verirler. Tip 1 diyabet, yaşamın her döneminde görülebilir ve tüm diyabet vakalarının yaklaşık % 7-10 kadarını kapsamaktadır. 10-15 yaş grubunda görülme oranı daha yüksektir. Hastalığın ilk döneminden itibaren insülin eksikliği veya yokluğu kendini gösterir. Bu hastalarda insülin yokluğuna bağlı olarak dolaşımda aşırı miktarda glukoz ve yağ asidi birikir. Bu birikim hiperozmolalite ve hiperketonemiye neden olur. İnsülin eksikliğinin şiddeti ve ortaya çıkış hızı hastalığın şiddetini belirler. Kanda artan glukoz, glomerüler reabsorbsiyon sınırını geçtiğinden idrarla atılmaya başlar^{21,22,78}.

"İnsüline bağlı olmayan diyabet", "erişkin diyabet" olarak da isimlendirilen tip 2 diyabet; tüm diyabet olgularının %90'dan fazlasını oluşturmaktadır ve en yaygın görülen diyabet şeklidir^{12,13}. Klinik olarak plazma glikoz düzeyi artışı ile seyreden ve genellikle başlangıçta insülin gereksinimi olmadan kontrol edilebilen bir hastalıktır. Heterojen bir hastalık grubu olup,

genellikle değişik düzeylerde insülin direnci, insülin salgılanmasında azalma ve glukoz yapımında artma ile karakterize olan bozuklukları kapsar. Tip 2 diyabete orta ve ileri yaş erişkinlerde daha sık rastlanır ve genellikle bireyler şişmandır. Tüm diyabet vakalarının % 80'ini oluşturan Tip 2 diyabetin toplumda görülme sıklığı % 2-5 arasındadır^{21,22}.

Günümüzde diyabet; tüm toplumlarda ve ırklarda görülebilen, sıklığı ve morbiditeye neden olan komplikasyonları nedeniyle tüm dünyada önemi gittikçe artan bir sağlık sorunudur. Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle tip 2 diyabet yaygınlığı hızla yükselmektedir¹¹.

2.9.2. Diyabetes Mellitus ve Erkek İnfertilitesi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, subfertil erkek sayısında bir artış olduğunu göstermektedir. Erkek infertilitesinin başlıca nedenleri arasında, metabolik hastalıklar, inmemiş testis gibi patolojiler, geçirilmiş enfeksiyonlar, genetik sebepler ve hormonal bozuklukların yanı sıra diyabet de yer almaktadır^{79,80}. Kandaki yüksek glukoz seviyesi, damarlara ve sinirlere zarar verir, bu tahribat hangi organda ise o organda sorunların ortaya çıkmasına neden olur. Diyabetin erkek üreme sağlığı üzerindeki etkisi başlıca cinsel güçsüzlükle karakterizedir. Ayrıca obezite, yorgunluk, libido kaybı ve ereksiyon bozukluğu gibi belirtilerde göstermektedir⁸¹. DM, spermatogenez sürecini (endokrin kontrolle veya direkt olarak) de etkilemektedir. Diyabetik sıçanlarda; testiküler ağırlık, sperm yoğunluğu ve testosteron düzeyinde azalmayla birlikte sıklıkla anormal spermatogenez gözlenmiştir. İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan diyabet çalışmalarında, seminiferöz tübüllerde atrofi, germ epitelinde düzensizlik ve hücre kaybı, spermatogenez arresti, bazal membranda kalınlaşma ile Leydig hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler rapor edilmiştir^{15,81}.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Düzenegi

Çalışmamızda 36 adet ortalama 200-300 gr ağırlığında Wistar albino türü yetişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (DETAUM) koşullarında; sıcaklığı ortalama 22°C olan odada, paslanmaz tel kapaklı plastik kafesler içerisinde 12 saat ışık 12 saat karanlıkta yaşatıldı. Hayvanlara adlibitum olarak hazır pellet yem ve çeşme suyu verildi.

36 hayvan, diyabet grubunda 12, torsiyon grubunda 18 ve kontrol grubunda 6 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (Çizelge 1).

Grup 1: Kontrol

6 sıçan, kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Grup 2: Diyabet

Bir gün öncesinden aç bırakılan deney hayvanlarına 50 mg/kg Streptozosin 0.01 M sodyum sitrat tamponunda (pH 4.3) çözdürülerek intraperitoneal olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örnekleri şeker ölçüm cihazı ile ölçülerek kan glukoz seviyesi > 300 mg/dL olanlar diyabetik olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi. Toplam 12 adet deney hayvanından oluşan diyabet grubu 2 alt grupta değerlendirildi.

Grup 2a. Diyabet Grubu (n=6): 14 gün boyunca 2 günde 1 kez glukoz seviyeleri ölçülerek diyabetin devam edip etmediği kontrol edilen 6 tane sıçan normal laboratuvar şartlarında yaşatıldı. Deney süresi sonunda sakrifiye edilerek intrakardiyak kanlarının alınmasının ardından skrotal bölgesi batikonla temizlenerek bistüri ile deri insizyonu yapıp testisleri açığa çıkarıldı. Testis doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için Bouin solüsyonuna, elektron mikroskopik inceleme için % 5'lik glüteraldehit solüsyonuna, immünohistokimyasal inceleme için % 4'lük paraformaldehit solüsyonuna içerisine alındı.

Grup 2b. Diyabet+Liraglutid (n=6): Diyabet grubundan geriye kalan 6 sıçana, 14 gün boyunca 0,3 mg/kg dozda serum fizyolojik içerisinde çözdürülen liraglutide (Nova Nordisk, USA) günde 2 kez subkutan olarak uygulandı. 14 günün sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek kan ve testis doku örnekleri alındı.

Grup 3: Torsiyon

İntraperitoneal ksilazin ve ketamin uygulanarak genel anestezi yapılan 18 adet sıçanın sol testisin skrotal bölgesi batikonla temizlenerek bistüri ile sol testis açığa çıkarıldı saat yönünde 720° döndürülerek torsiyon gerçekleştirildi. Torsiyonun sürdürülebilmesi için testis tunika albugineasından skrotuma 5/0 ipek sütür ile tespit edildi. Cilt 5/0 ipek sütür ile geçici olarak kapatıldı. Torsiyon yapılan sıçanlar 3 alt grupta değerlendirildi.

Grup 3a. Torsiyon grubu (n=6): 6 sıçan 3 saatlik torsiyon süresinden sonra sakrifiye edildi. Kan ve testis doku örnekleri ışık, elektron ve immünohistokimyasal incelemeler için solüsyonlara alındı.

Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon Grubu (n=6): 6 adet sıçan torsiyondan 3 saat sonra cilt sütürleri açılıp tespit dikişleri alındıktan sonra testis saat yönünün tersine döndürülerek düzeltildi. İnsizyon tekrar 5/0 ipek sütür ile kapatıldı ve reperfüzyonu sağlanan ratlar 14 gün boyunca normal laboratuvar şartlarında yaşatıldı. 14.günün sonunda kan ve testis doku örnekleri alındı.

Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon+Liraglutid (n=6): Kalan son 6 sıçana torsiyonun 2.saatinde subkutan olarak 0,3 mg/kg liraglutid enjekte edildikten 1 saat sonra detorsiyon yapıldı ve günde 2 kez olacak şekilde enjeksiyona devam edildi. 14.günün sonunda genel anestezi altında bu gruptan da örnekler alındı.

Çizelge 1. Deney gruplarının şematik gösterimi

GRUP 1	GRUP 2		GRUP 3		
	DİYABET		TORSİYON		
n:6 KONTROL	n:6 D	n:6 D+L	n:6 T	n:6 T/D	n:6 T/D+L



Şekil 7. Torsiyon yapılmış testis görünümü



Şekil 8. Torsiyonlu testisin görünümü



Şekil 9. Detosiyonlu testisin görünümü

Deney hayvanlarından elde edilen testis doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için Bouin solüsyonuna, elektron mikroskopik inceleme için % 5'lik gluteraldehit solüsyonuna, immünohistokimyasal tetkik için %4'lük paraformaldehit içerisinde alınarak tespit edildi. Anabilim dalımız laboratuvarlarında rutin yöntemler uygulanarak takip edildi. Elde edilen doku bloklarından ışık ve elektron mikroskopik kesitler alındı. Apoptotik hücre markerı olan kaspaz-3 aktivasyonu immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. Biyokimya anabilim dalı laboratuvarlarında SOD, MDA ve testosteron değerleri ölçüldü. Elde edilen verilerin, kontrol ve deney gruplarıyla karşılaştırılması uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

3.2. Işık Mikroskopik Takip Yöntemleri

Boin solüsyonunda 4 saat tespit edilen testis doku örnekleri önce 2 saat % 50'lik, sonra 2 saat % 70'lik alkolde bekletildi. Daha sonra dokuların Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile Çizelge 2'de belirtilen rutin doku takipleri yapıldı.

Çizelge 2. Işık mikroskopik doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Doku takibi bittikten sonra dokular parafin içine gömülerek blok haline getirildi. Elden edilen bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında parafin kesitler alınarak, Hematoksilen- Eozin boyası ile boyandı. Olympus BX50 (Tokyo,

Japonya) ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi. Randomize seçilen seminiferöz tübüllerin epitel yüksekliği ve çap ölçümleri Cellsence Imaging 6.1 programı yardımıyla ölçüldü. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3. Elektron Mikroskopik Takip Yöntemleri

Elde edilen testis doku örnekleri Millionig fosfat tamponu⁸² ile hazırlanmış, % 5'lik glutaraldehit solüsyonuna konuldu. pH'sı 7,4 olan % 5'lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat kadar bekletilen doku parçaları daha sonra içerisinde bir miktar % 5'lik glutaraldehit bulunan dışçı mumu ile kaplanmış petri kaplarına alındı. Alınan dokular jilet yardımıyla yaklaşık olarak 1 mm³ büyüklükte parçalara ayrıldı. Bu işlemden sonra tekrar 3 saat süreyle % 5'lik glutaraldehit solüsyonunda tespit işlemine devam edildi. Tespit işleminden sonra dokular Millionig fosfat tamponunda 2 kez 10' ar dakika süreyle bekletildi. Millionig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1'lik osmium tetraoksit solüsyonu ile 2 saatlik ikinci tespit işlemi uygulandı. İkinci tespitten sonra dokular tekrar Millionig fosfat tamponu ile 2 kez 10'ar dakika süreyle yıkandı. Dokular derecesi giderek artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi (Çizelge 3).

Çizelge 3. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon, şeffaflandırma ve immersiyon işlemi

%50'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%70'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%86'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%96'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika

Son %100'lük etil alkol safhasına kadar olan takip işlemleri +4 °C' de buzdolabında yapıldı. Sonraki işlemlere ise oda ısısında devam edildi. Dehidratasyondan sonra doku parçaları 2 kez 15' er dk propilen oksitte bekletilerek, propilen oksit ve gömme materyali karışımında;

1 hacim propilen oksit + 1 hacim gömme materyali rezin ile 30 dk

1 hacim propilen oksit + 1 hacim gömme materyali rezin ile 30 dk immerse edildi.

Dehidratasyondan sonra doku parçaları, taze hazırlanmış gömme materyali içerisinde alınarak bir gece rotatorda karıştırıldı (Çizelge 4).

Çizelge 4. Gömme materyali içeriği

Araldit	CY 212	20 ml
Sertleştirici	HY 964	20 ml
Hızlandırıcı	DY 064	0,6 ml
Plastikleştirici-Dibütil fitalat		1 ml

Ertesi gün doku parçaları yeni hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömüldü. 60° C'lik etüvde 48 saat polimerize edildi. Etüvden çıkarılan bloklar soğumaya bırakıldı. Reichert Ultracut S ultramikrotomuyla bloklardan 500 A⁰ kalınlığında kesitler alınarak 200-300 gözenekli bakır gridlere yerleştirildi. %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendi.

3.4. İmmünohistokimya Yöntemleri

Kaspaz-3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir. Kaspazlara karşı geliştirilmiş antikolar kullanılarak, sitoplazmik kaspaz ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, apoptozisin tespitinde sık kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler için deney hayvanlarından

elde edilen dokular %4'lük paraformaldehit içerisinde alınarak oda ısısında 48-72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra formalinin uzaklaştırılması amacıyla dokular akarsu ile yıkandı. Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile rutin doku takipleri yapıldı. Doku takibi bittikten sonra dokular parafin içine gömülerek blok haline getirildi. Elde edilen bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında parafin kesitler polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. Kesitler ilk önce fön makinesi ile kurutularak 15 dakika buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkarılan kesitler tekrar fönle kurutularak, 60⁰ C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra kesitler oda ısındaki ksilol içerisinde alındı ve derecesi giderek azalan alkol serileri ile hidrate edildi ve distile su içine alındı. Ardından sitrat solüsyonu içerisinde alınan kesitler 95⁰ C'lik su banyosunda, 30 dakika bekletilerek antijenlerin açığa çıkması gerçekleştirildi. Oda ısısında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkanarak endojen peroksitlerin bloklanması için metanolde çözdürülen %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) karışımı içerisinde alındı ve 10-20 dakika kadar bekletildikten sonra, distile su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice temizlenip, kurulandıktan sonra üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek için blocking solüsyonu (29593, ScyTek, USA) damlatıldı ve oda ısısında, nemli ortamda 10 dakika bekletildi. Ardından kesitler fosfat tamponundan geçirilerek, dokuların etrafı kurulandı ve 1/500 oranında sulandırılan, anti kaspaz-3 primer antikoru damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4⁰ C'de, nemli ortamda 1 gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikorlar yerine, dilüsyon solüsyonu damlatıldı. Primer antikorla muamele edilen kesitler, distile su ve PBS'den geçirildi ve üzerlerine Biotin (29578, ScyTek, USA.) damlatılarak 15 dk oda ısısında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS'de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (29757, ScyTek, USA.) damlatılarak, 20 dakika oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlerin üzerine, aminoetil karbozol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu ile yıkandı ve doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilen solüsyonunda 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları

çekildi.

3.5. Biyokimyasal Analiz

Tüm deney gruplarından alınan intrakardiyak kan örnekleri 2000-3000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma kısmı ayrıldı. Serum kısmı ependorf tüplerde -20⁰ C'de bekletildi. Testosteron hormonu, SOD ve MDA ölçümleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından manuel olarak yapıldı ve Epoch Elisa Reader cihazı ile sonuçlar okundu.



4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

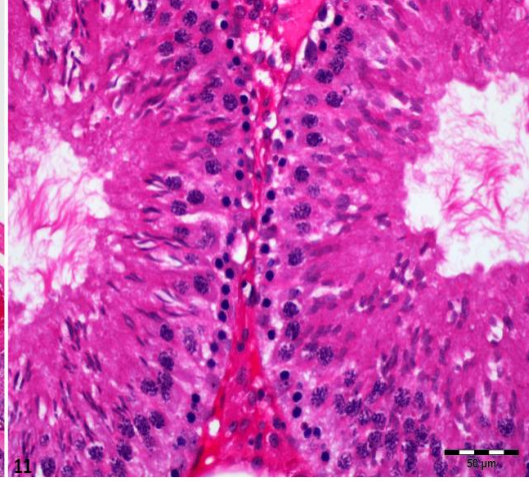
Çalışmamızda elde edilen testis dokularına ait parafin kesitler örnekleri Hemotoksilen-Eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

4.1.1. Grup 1: Kontrol Grubu

Normal laboratuvar şartlarında yaşatılan sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde kontrol grubuna ait testisin, fibroelastik bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea ile sarılı olduğu görüldü. Parankima normal görünümlü seminiferöz tübüller ve interstisyumdan oluşmaktaydı. Seminiferöz tübüller düzgün membrana propriaya ve seminiferöz epitele sahipti. Tübüller spermatojenik hücreler ve Sertoli hücrelerinden oluşan epitel ile döşeliydi. Bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücreleri 1-2 çekirdekçikle karakterize üçgen ya da oval şekilli çekirdek içermekteydi. Sertoli hücreleri gibi spermatogonyumlarda yoğun kromatin yapısına sahip oval çekirdekleriyle karakterizedydi. Seminiferöz tübül epitelinin en büyük hücreleri olan primer spermatositler, granüler kromatin yapısı sergileyen bir çekirdeğe ve geniş sitoplazmaya sahipti. tübül lümenine yakın yerleşimli olan spermatid ve spermatozoonlar görülmekteydi. Seminiferöz tübüller arasında yer alan interstisyum, kan damarları, lenfatikler, makrofajlar ve fibroblastların yanı sıra poligonol şekilli, eozinofilik sitoplazmalı, büyük ve kromatinden fakir çekirdekleriyle karakterize Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) içermekteydi (Şekil 10,11).



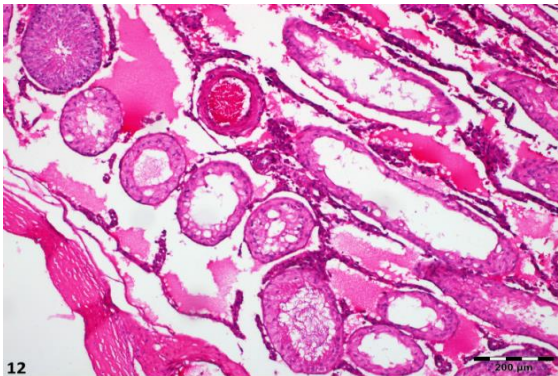
Şekil 10. Kontrol grubu. Normal görünümlü tunika albuginea ve seminiferöz tübüller izlenmektedir. H&E. Bar=200 µm.



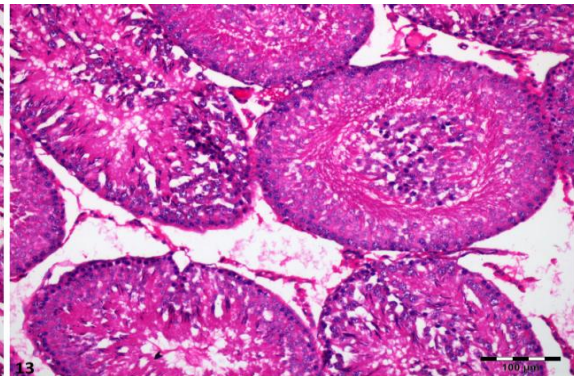
Şekil 11. Kontrol grubu. Normal görünümlü seminiferöz tübüller görülmektedir. H&E. Bar=50µm.

4.1.2. Grup 2: Diyabet

Grup 2a: Diyabet Grubu: İntraperitoneal olarak 50 mg/kg streptozosin uygulamasından 72 saat sonra diyabetik olan sıçanların testis doku örnekleri incelendi. Normal görünümlü seminiferöz tübüllerin yanı sıra hiyalinizasyon ve vakuolizasyon gösteren tübüllerin varlığı dikkati çekmekteydi. İnterstisyum ödemli görünümdeydi. Seminiferöz tübüllerde lümende immatür hücre birikimleri dikkati çekti. Etkilenmiş tübüllerde membrana propria düzensizlikler izlenmekteydi (Şekil 12,13).

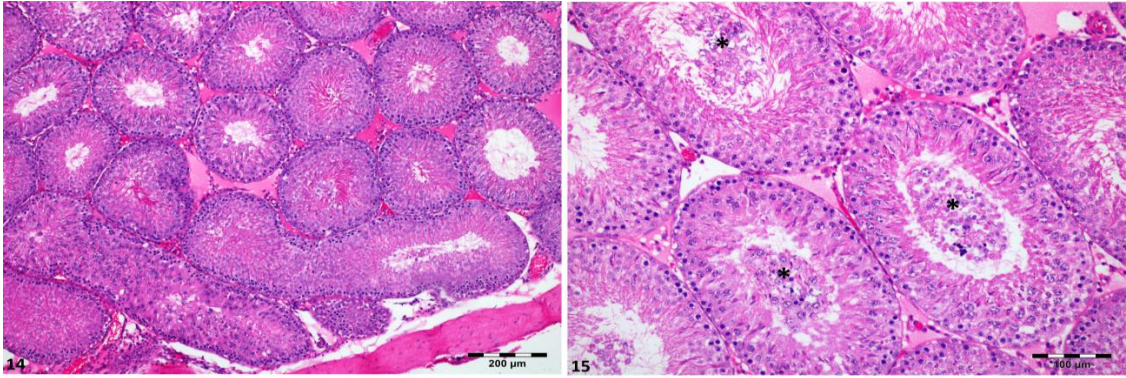


Şekil 12. Grup 2a. Diyabetli sıçanlarda normal görünüme sahip tübüllerin yanı sıra dejeneratif tübüller de izlenmektedir. H&E. Bar=200 µm.



Şekil 13. Grup 2a. Diyabetli sıçanlarda seminiferöz tübül lümeninde immatür hücre birikimi görülmektedir. H&E. Bar=100 µm.

Grup 2b: Diyabet + Liraglutid Grubu: 50 mg/kg streptozosin ile diyabet oluşturulan sıçanlara 14 gün boyunca 0,3 mg/kg dozda liraglutidin günde 2 kez subkutanöz olarak enjekte edildi. Bu gruptaki sıçanların testis doku örneklerinde tunika albuginea diyabet grubundaki gibi görülmekteydi. Nispeten normale yakın seminiferöz tübüller ve hafif ödemli interstisyum izlendi. Membrana propria diyabet grubuna göre daha düzenli gözlemlendi. Ancak yine bazı tübüllerde immatür hücre birikiminin devam ettiği dikkati çekti (Şekil 14,15).

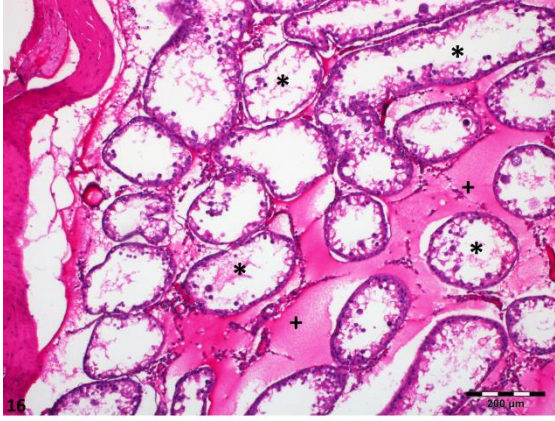


Şekil 14. Grup 2b. Nispeten normal görünümlü tunika albuginea ve seminiferöz tübüller görülmektedir. H&E. Bar=200 µm.

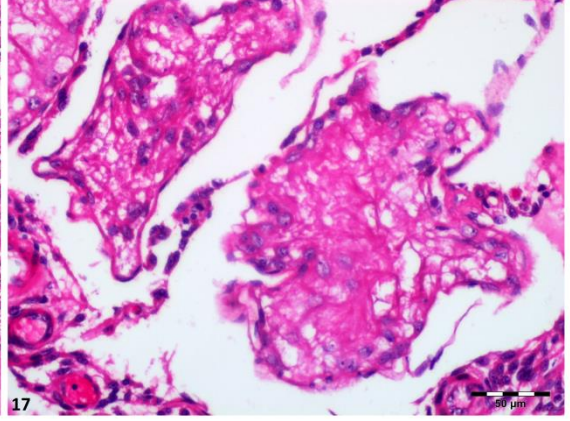
Şekil 15. Grup 2b. Seminiferöz tübül lümeninde immatür hücre birikimi görülmektedir (*). H&E. Bar=100 µm.

4.1.3. Grup 3: Torsiyon

Grup 3a: Torsiyon Grubu: 3 saatlik torsiyondan sonra sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, tunika albugineanın belirgin bir kalınlaşma gösterdiği dikkati çekti. Tunika vasküloza vakuollü görünümdeydi. Seminiferöz tübüllerin hemen hepsi tamamen dejeneratif görünümdeydi. Tübüllerin lümeninde çok çekirdekli dev hücreler ve apoptotik cisimcikler izlendi. İnterstisyum ödemli ve hemorajik görünümdeydi (Şekil 16,17).

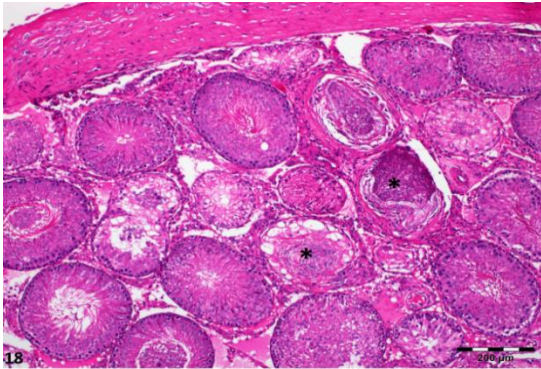


Şekil 16. Grup 3a. Tamamen dejenerasyon gösteren seminiferöz tübüller (*) ve ödemli interstisyum (+) izlenmektedir. H&E. Bar=200 µm.

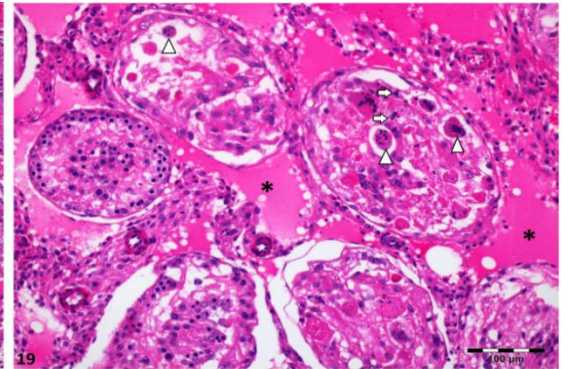


Şekil 17. Grup 3a. Hiyalinizasyon ve vakuolizasyon gösteren dejeneratif seminiferöz tübüller görülmektedir. H&E. Bar=50 µm.

Grup 3b: Torsiyon/Detorsiyon Grubu: Torsiyondan 3 saat sonra detorsiyon yapılan ve 14 gün yaşatılan sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinde tunika albuginea'nın kalınlaştığı görüldü. Seminiferöz tübüllerin çoğu torsiyon grubuna benzemekle birlikte bazı tübüllerde spermatojenik hücreler izlenmekteydi. Tübül lümeninde immatür hücre birikiminin yanı sıra çok çekirdekli dev hücreler ve apoptotik cisimcikler gözlenmekteydi. İnterstisyumda yaygın ödem ve inflamasyon belirlendi (Şekil 18,19).

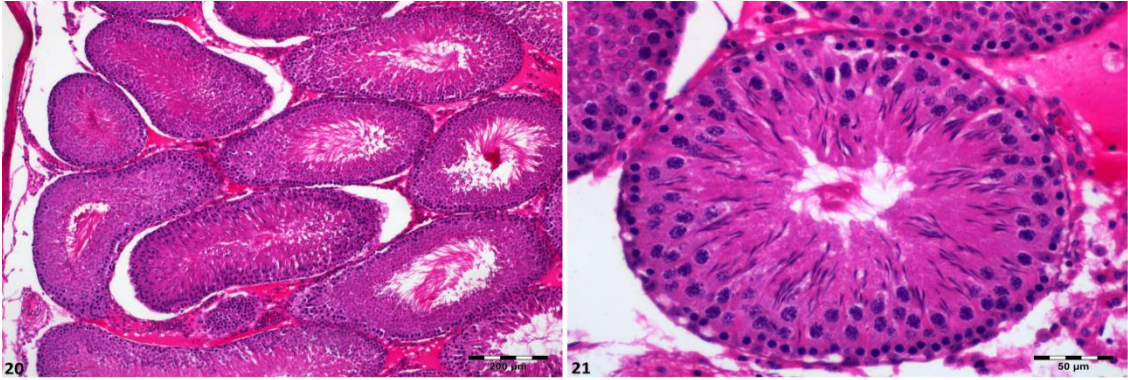


Şekil 18. Grup 3b. Çoğu dejenerasyon gösteren seminiferöz tübüller(*) izlenmektedir. H&E. Bar=200 µm.



Şekil 19. Grup 3b. Çok çekirdekli dev hücreler (ok başı) ve apoptotik cisimciklere (ok) sahip dejeneratif seminiferöz tübüller, ödemli interstisyum(*) gözlenmektedir. H&E. Bar=100 µm.

Grup 3c: Torsiyon/Detorsiyon + Liraglutid Grubu: Torsiyon ve detorsiyon yapılan, 14 gün 0,3 mg/kg dozda günde 2 kez subkutan liraglutid enjeksiyonu uygulanan deney hayvanlarının testis doku örnekleri incelendi. Tunika albuginea'da kalınlaşmanın azaldığı görüldü. Nispeten normal seminiferöz tübüllerin varlığı dikkati çekti. Seminiferöz tübüllerde dökülmenin azaldığı ve immatür hücre birikiminin gözlenmediği farkedildi. Çoğu seminiferöz tübüllerde spermatojenik hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin morfolojik olarak normal olduğu gözlenirken, interstisyumda hafif ödem izlenmekteydi (Şekil 20, 21).



Şekil 20. Grup 3c. Nispeten normal görünümlü tunika albuginea ve seminiferöz tübüller izlenmektedir. H&E. Bar=200 µm

Şekil 21. Grup 3c. Normal görünümlü seminiferöz tübüller görülmektedir. H&E. Bar=50 µm.

4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Grup 1: Kontrol grubu

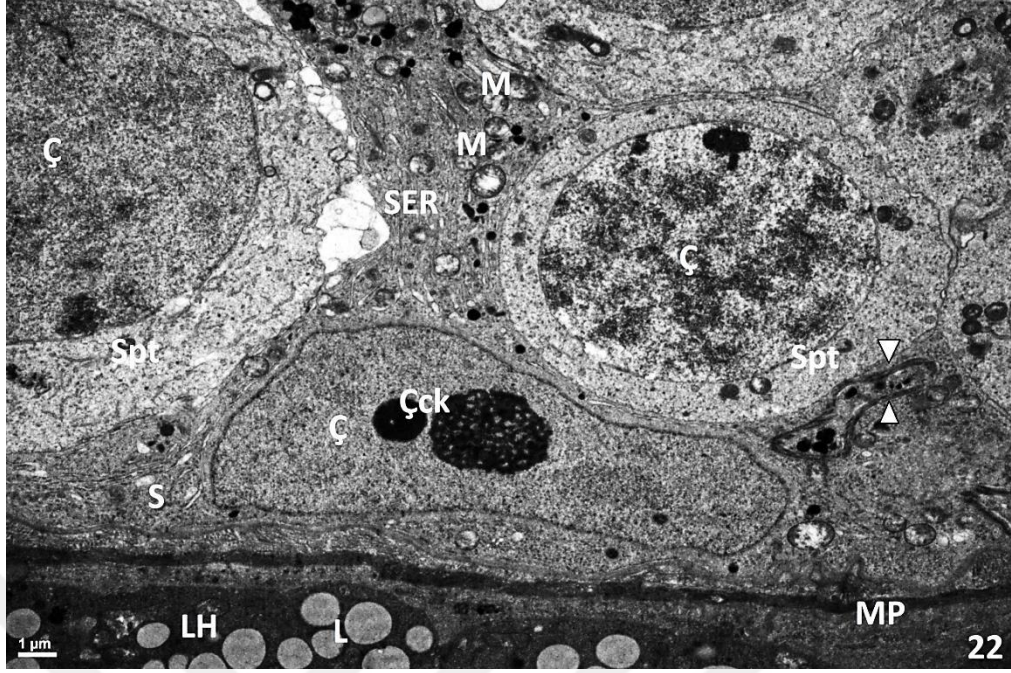
Kontrol grubuna ait testis doku örnekleri ince yapı düzeyinde değerlendirildi. Membrana propria normal kalınlıktaydı. Bazal lamina tek tabaka halinde düzgün bir yapı göstermekteydi. Miyoid hücreler normal elektron densliğe sahipti ve çekirdekleri yassı şekilli olup, periferal kromatin sergilemekteydi. Sitoplazmaları az sayıda mitokondriyon ve mikropinositotik veziküller içermekteydi. İç ve dış hücresel olmayan tabakada az sayıda kollajen lif bulunmaktaydı. Dış epitalyal tabaka düzenli görülmekteydi (Şekil 22).

Bazal lamina üzerine oturan normal elektron densliğe sahip Sertoli hücrelerinin derin invaginasyonlara sahip çekirdekleri, 1-2 çekirdekçik

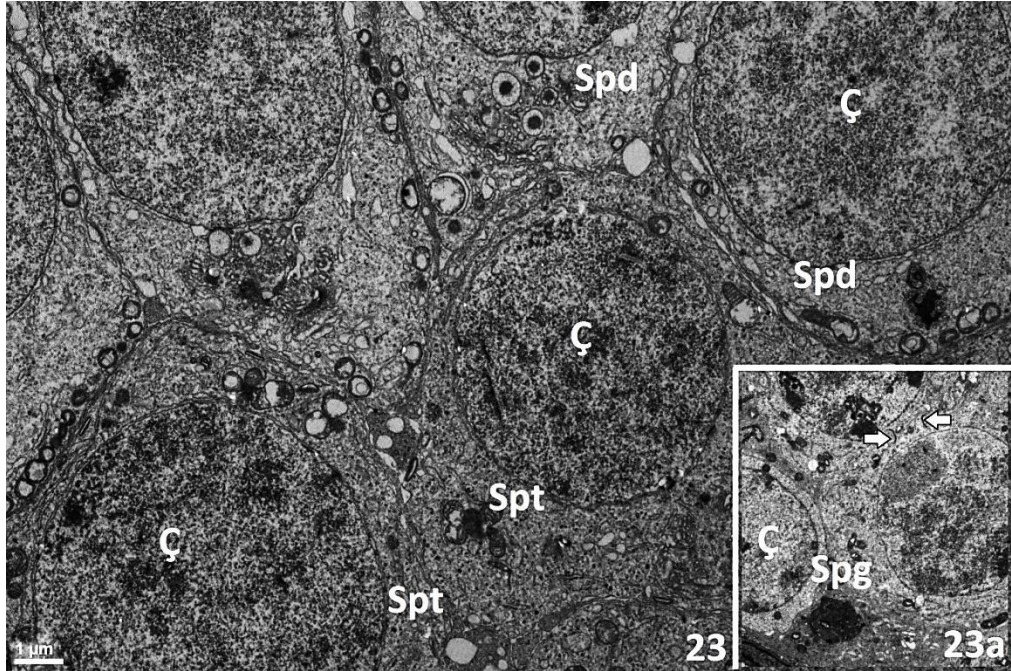
içermekteydi. Sitoplazmaları yaygın SER, túbüler ve fincan şekilli mitokondriyonlar, GER, birkaç lipid damlacığı, elektron dens yapılar ve glikojen granülleri içermekteydi. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar normal görünmekteydi (Şekil 22).

Normal elektron densliğe sahip ve bazal lamina üzerine oturan spermatogonyumlar, sferikal bir çekirdeğe sahipti. Organel yönünden fakir olan sitoplazmaları birkaç mitokondriyon ve endoplazmik retikülüm sisternaları içermekteydi. Seminiferöz túbül epitel hücreleri arasında, birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı normal elektron denslikteki spermatositler, sferikal çekirdekleriyle karakterizeydi. Sitoplazmaları; gruplaşmış mitokondriyonlar, mikrotübüller, ER sisternaları sergilemekteydi (Şekil 23a). Yuvarlak çekirdekli spermatid sitoplazmasında gelişmiş Golgi kompleksi, kristal mitokondriyonlar ve akrozomal veziküller izlendi. Akrozomal vezikül spermin baş kısmını belirleyecek şekilde çekirdeğin yarısını sarmaktaydı (Şekil 23).

İnterstisyumda fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, kan ve lenf damarlarının yanı sıra steroid hormon sentezinden sorumlu Leydig hücreleri de bulunmaktaydı. Düzensiz sınırlı çekirdeğe sahip Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları görülmekteydi (Şekil 22).



Şekil 22. Kontrol Grubu. Normal görünümü seminiferöz tübül ve Leydig hücresi (LH) izlenmektedir. Membrana propria (MP), Sertoli hücresi (S), spermatozoit (Spt), çekirdek (Ç), çekirdekçik (Çck), agranüler endoplazmik retikülüm (SER), mitokondriyon (M), sıkı bağlantılar (ok başı), lipid damlacığı (L). Bar=1 µm.



Şekil 23. Kontrol grubu. Normal görünümü spermatojenik hücreler izlenmektedir. Spermatozoit (Spt), akrozomal faz spermatidler (Spd), çekirdek (Ç). Bar=1 µm.

Şekil 23.a. Kontrol grubu. Sitoplazmik köprülerle (ok) birbirine bağlı spermatozoitler, spermatogonyum (Spg) görülmekte. Bar=0,2 µm.

4.2.2. Grup 2

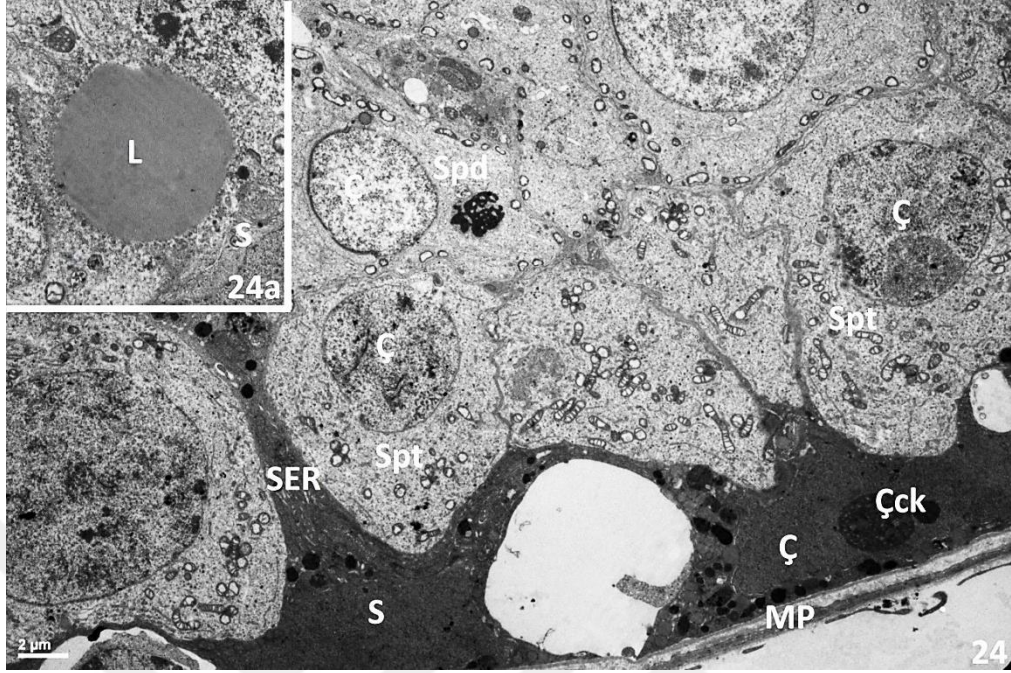
Grup 2a: Diyabet Grubu: 50 mg/kg streptozosin ile diyabet oluşturulan ve 14. günün sonunda sakrifiye edilen sıçanların testis doku örnekleri elektron mikroskofta incelendi.

Membrana propria kontrol grubuna benzemektedir. Bazal lamina düzgün, miyoid hücreler normal elektron yoğunluğuna sahiptir (Şekil 24, 25).

Bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücrelerinin elektron yoğunluğu artmıştır. Derin invaginasyonlar sergileyen çekirdek 1-2 çekirdekçik içermektedir. Sitoplazmalarında lizozomal yapılar, dev lipid damlacıkları, SER vakuolizasyonu, şişkin mitokondriyonlar bulunmaktadır. Sertoli hücresi-Sertoli hücresi arasındaki sıkı bağlantılar normal görülmektedir (Şekil 24, 24a, 25).

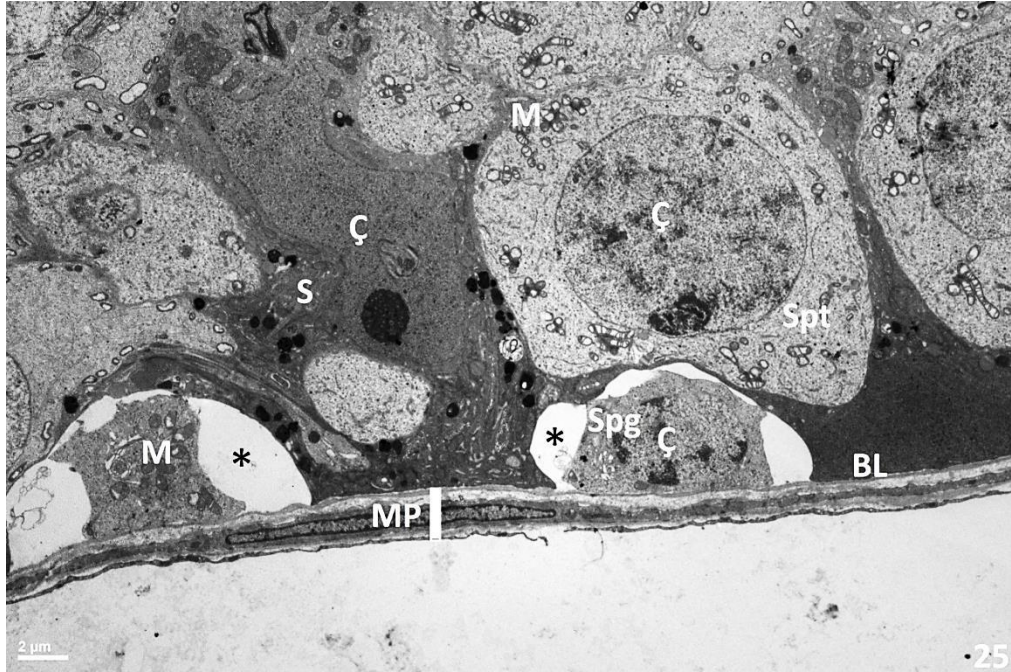
Sertoli hücrelerine komşuluk eden bazal lamina üzerine oturmuş spermatogonyumlar büzüşmüş ve çevrelerinde düzensiz boşluklar oluşmuştur. Çekirdek kromatin yamalarına sahip sferikal şekilli sitoplazmaları birkaç mitokondriyon, ER sisternaları içermektedir. Sinaptonemal kompleks varlığıyla karakterize çekirdeğe sahip spermatositler, kontrol grubuna benzemektedir. Bazı tübüllerde akrozomal fazdaki spermatidlerde akrozomal kılıfta yer yer bozulmalar dikkati çekmektedir (Şekil 24, 25).

İnterstisyel Leydig hücreleri normal elektron yoğunluğundadır. Düzensiz sınırlı çekirdek periferik kromatin yamaları sergilemektedir. Sitoplazmalarında, mitokondriyal dejenerasyon ve SER vakuolizasyonu izlenmektedir (Şekil 26).

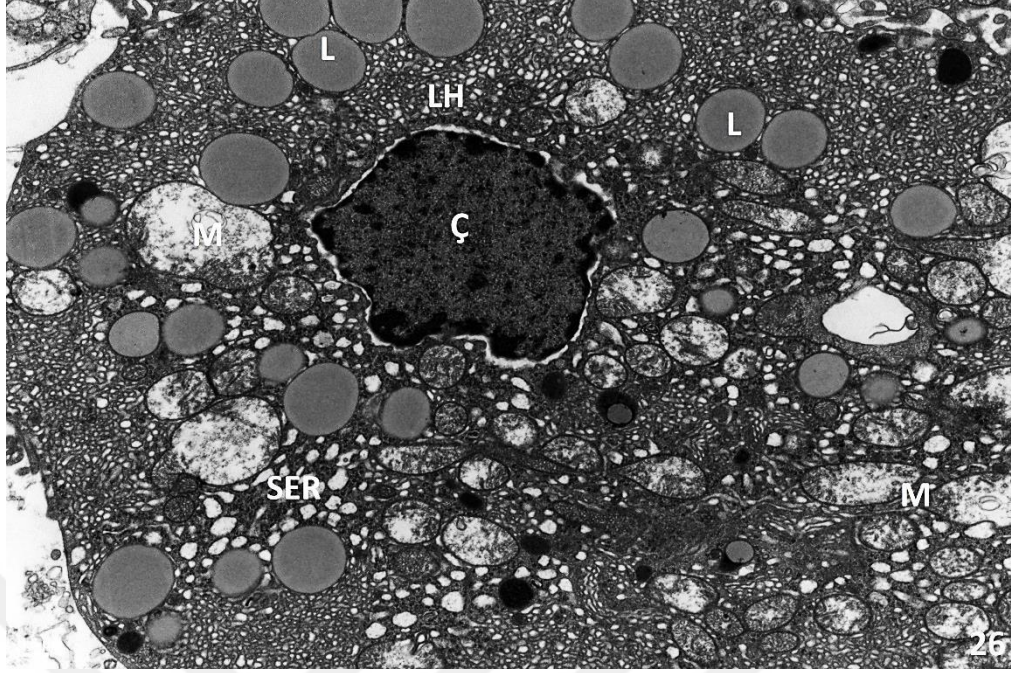


Şekil 24. Grup 2a. Elektron densliği artmış Sertoli hücresi (S). Sinoptonemal kompleks ile karakterize çekirdeğe (Ç) sahip spermatositler (Spt) ve akrozomal spermatidler (Spd) görülmektedir. Membrana propria (MP), Agranüler endoplazmik retikulum (SER). Bar=2 µm.

Şekil 24.a. Grup 2a. Sertoli hücresi (S) sitoplazmasında dev lipid damlacığı (L) izlenmektedir. Bar=1 µm



Şekil 25. 2a grubu. Diyabet. Bazal lamina (BL) üzerine oturan büzülmüş spermatogonyumlar (Spg), hücreler arasında düzensiz boşluklar (*) izlenmektedir. Membrana propria (MP), Sertoli hücresi (S), spermatosit (Spt) çekirdek (Ç), mitokondriyon (M). Bar=2 µm.



Şekil 26. Grup 2a. Hiperkromatik çekirdek yapısına sahip Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmasında, mitokondriyal dejenerasyon (M) ve agranüler endoplazmik retikulum (SER) vakuolizasyonu izlenmektedir. Çekirdek (Ç), lipid damlacığı (L), Bar= 0,5 µm

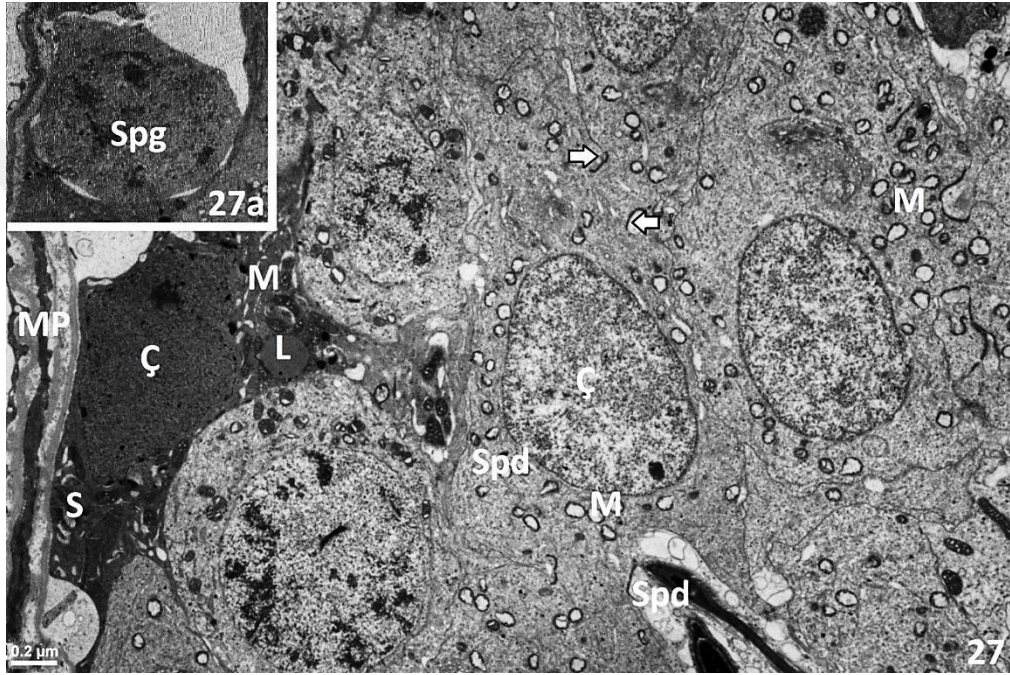
Grup 2b. Diyabet+Liraglutid Grubu: Diyabet oluşturulduktan sonra 14 gün liraglutid enjeksiyonu yapılan sıçanlardan elde edilen örneklerde membrana propria normal görülmekteydi. Yer yer düzensizlikler sergileyen bazal lamina ve miyoid hücreler genellikle bilinen normal ince yapısını korumaktaydı (Şekil 27).

Bazı tübüllerde Sertoli hücreleri, diyabet grubundaki gibi elektron dens hale gelmişti. Sitoplazma hafif SER vakuolizasyonun yanı sıra farklı büyüklüklerde artmış lipid damlacıkları ve fagositik cisimcikler içermekteydi (Şekil 27).

Sferikal çekirdekleriyle ve organel yönünden fakir sitoplazmalarıyla karakterize spermatogonyumlar yer yer büzüşmüş ve çevrelerinde düzensiz boşluklar oluşturmuştu (Şekil 27a). Spermatogenez sürecini yansıtan spermatozoidler, normal elektron denslikteydi. Yuvarlak çekirdekli spermatozoidlerde sitoplazma gruplaşmış mitokondriyonlar sergilemekteydi. Sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı spermatojenik hücreler görülmekteydi (Şekil 27). Spermatozoidler akrozomal düzensizlikler sergilemekteydi. Çekirdek sınırı düzensiz olup, çekirdek kılıfında yer yer çözümler bulunmaktaydı. Kristal mitokondriyonlar hücre periferinde dizilmişlerdi (Şekil 28). Bazı

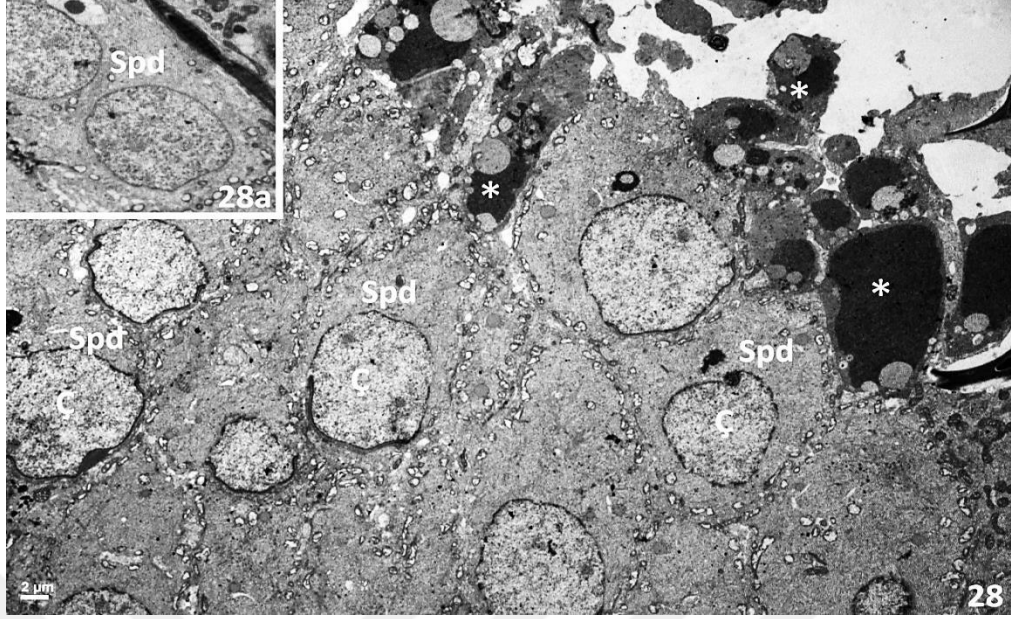
tübüllerde çift çekirdekli akrozomal faz spermatidler de izlendi (Şekil 28a, 28). Ayrıca tübül lümeninde immatur hücrelerin yanı sıra fagositik ve apoptotik cisimcikler de yer almaktaydı (Şekil 28).

Normal elektron densliğe sahip Leydig hücrelerinde, düzensiz sınırlı çekirdek periferel kromatin sergilemekteydi. Sitoplazma, azalmış lipid damlacıkları ile SER vakuolizasyonu ve farklı büyüklüklerde yer yer tübüler kristalleri şişkinleşmiş ve dejeneratif mitokondriyonlar içermekteydi (Şekil 29).



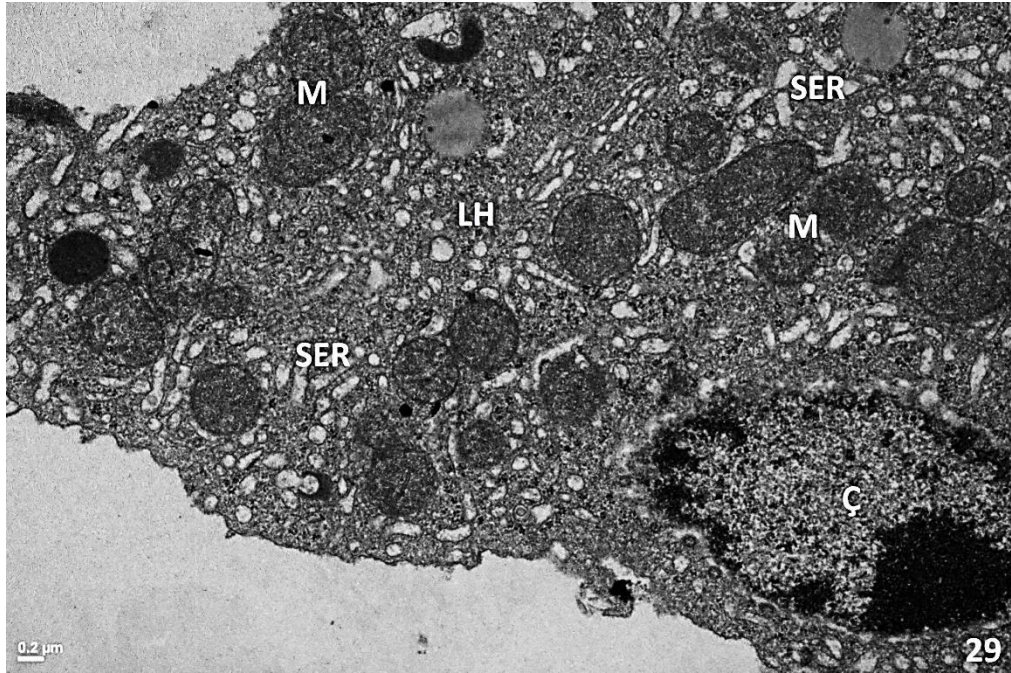
Şekil 27. Grup 2b. Elektron densliği artmış Sertoli hücresi (S), sitoplazmik köprülerle (ok) birbirine bağlı spermatojenik hücreler, bazal laminaya kadar sokulan spermatid (Spd), membrana propria (MP), çekirdek (Ç), mitokondriyon (M), lipid damlacığı (L) izlenmektedir. Bar= 0,2 µm.

Şekil 27.a. Grup 2b. Büzüşmüş spermatogonyum (Spg) görülmektedir. Bar=0,5 µm.



Şekil 28. Grup 2b. Düzensiz sınırlı akrozomal faz spermatidler (Spd), lümene yakın apoptotik ve fagositotik cisimcikler (*) izlenmektedir. Bar=2 µm.

Şekil 28.a. Grup 2b.Çift çekirdekli anormal spermatid (Spd) görülmektedir. Bar=2 µm.



Şekil 29. Grup 2b Normal elektron densliktteki Leydig hücresi (LH), agranüler endoplazmik retikulum (SER), mitokondriyon (M), çekirdek (Ç) izlenmektedir. Bar=0,2 µm.

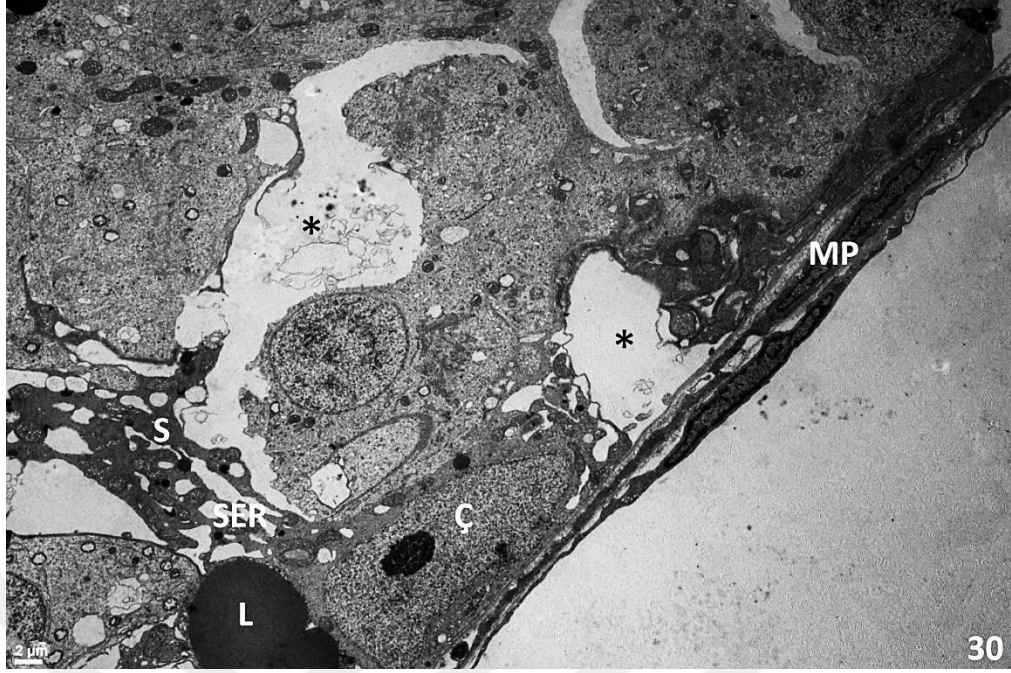
4.2.3. Grup 3

Grup 3a: Torsiyon Grubu: 3 saatlik torsiyondan sonra sakrifiye edilen sıçanların testis doku örnekleri ince yapı düzeyinde incelendi. Membrana propria total kalınlığında artış gözlemlendi. Bazal laminanın yer yer bilaminar hale gelerek tübüle doğru çıkıntı yaptığı izlendi. İç hücresel olmayan tabakada kollajen lif miktarı artmıştı. Miyoid hücreler elektron dens hale gelerek vakuollü bir sitoplazma sergilemekteydi (Şekil 30).

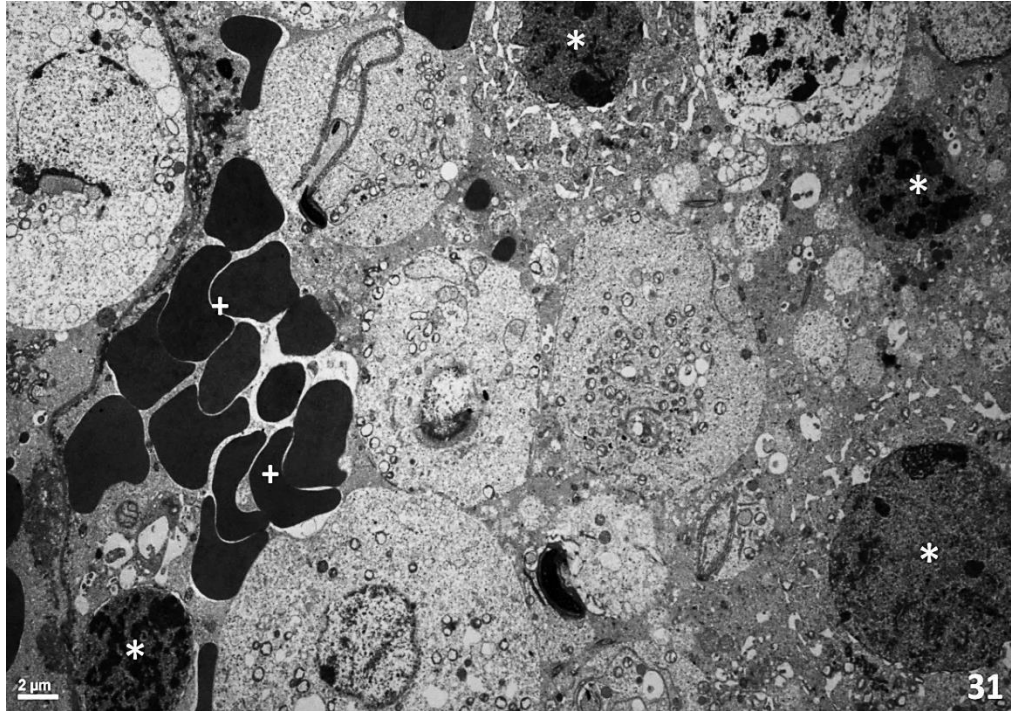
Bazal lamina üzerine oturan hücresel bütünlüğü bozulmuş Sertoli hücreleri belirgin çekirdekçikle karakterize bir çekirdeğe sahipti. Sitoplazma yaygın SER vakuolizasyonunun yanı sıra dev lipid damlacıkları, dejeneratif mitokondriyonlar, dens yapılar içermekteydi. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bozulmuştu (Şekil 30).

Torsiyondan etkilenen spermatogonyumların büzüştüğü ve tamamen dejenere olarak yerlerinde geniş boşlukların oluştuğu gözlemlendi. Spermatojenik hücreler apoptotik ve litik değişiklikler sergilemekteydi. Sertoli hücrelerinin etkilenmesine bağlı olarak bu hücreler, hücresel bütünlüklerini kaybetmişlerdi. Torsiyondan etkilenen tübüllerde immatür spermatojenik hücreler, anormal spermatidlerin yanı sıra hemorajik alanlar dikkati çekmekteydi (Şekil 30, 31).

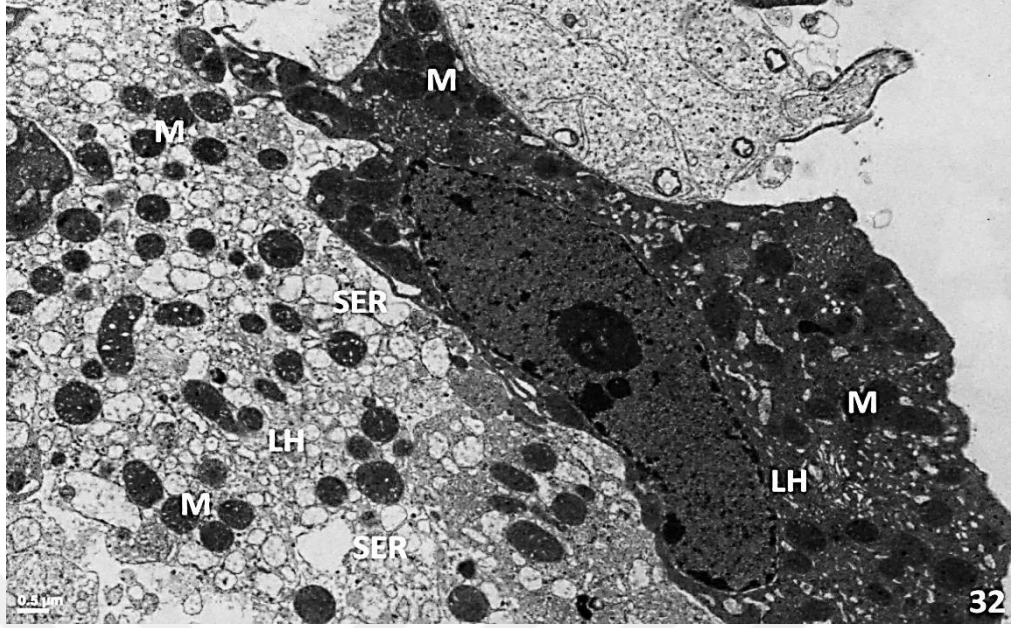
İnterstisyumda bazı Leydig hücreleri elektron dens hale gelirken, bazıları litik değişiklikler sergilemekteydi. SER vakuolizasyonuna bağlı olarak köpüğümsü görülen sitoplazmalarında pek çok dejeneratif mitokondriyon, sisternaları genişlemiş Golgi kompleksi izlenmekteydi (Şekil 32).



Şekil 30. Grup 3a. Hücresel bütünlüğü bozulmuş Sertoli hücresi (S), tübül epitel hücreleri arasında geniş boşluklar (*), membrana propria (MP), çekirdek (Ç), lipid (L), agranüler endoplazmik retikulum (SER) vakuolizasyonu izlenmektedir. Bar=2 µm.



Şekil 31. Grup 3a. Hemorajik alanlar (+) içeren, piknotik ve apoptotik (*) spermatojenik hücrelere sahip seminiferöz tübül izlenmektedir. Bar=2 µm.



Şekil 32. Grup 3a. Farklı elektron denslikler gösteren Leydig hücresi (LH), mitokondriyon (M), agranüler endoplazmik retikulum (SER) vakuolizasyonu izlenmektedir. Bar=0,5 µm.

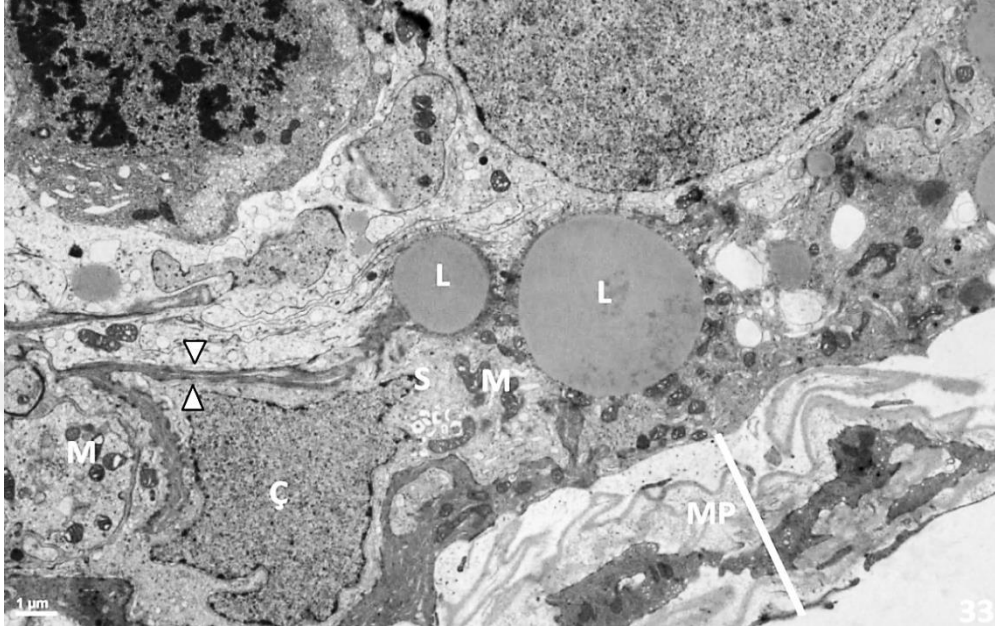
Grup 3b. Torsiyon/Detorsiyon Grubu: 3 saatlik torsiyondan sonra detorsiyon yapılan ve 14 gün yaşatılan sıçanlardan elde edilen doku örnekleri elektron mikroskopta incelendi.

Membrana proprianın total kalınlığı son derece artmıştı. Bazal lamina bilaminar, kıvrıntılı ve düzensiz görülmekteydi. Yer yer tübül lümenine doğru invaginasyonlar göstermekteydi. İç hücresel olmayan tabaka mikroflaman artışı ve hafif kollajen lif içermekteydi. Pek çok mikropinositotik veziküller içeren dejeneratif miyoid hücreler gözlemlendi. Dış hücresel tabaka, bazal lamina gibi düzensizlikler ve kıvrıntılar sergilemekteydi (Şekil 33).

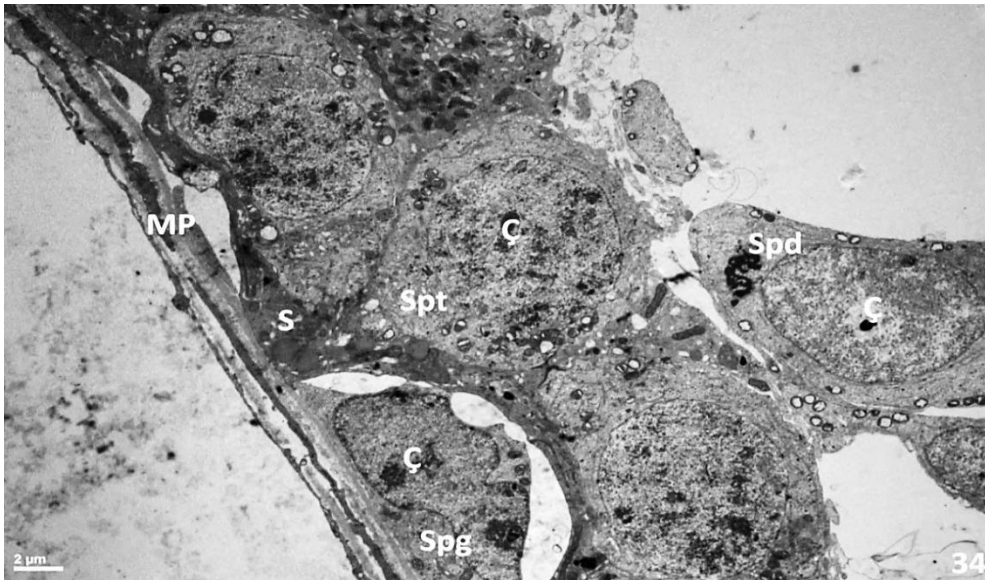
Sertoli hücreleri düzensiz sınırlı çekirdekleri ile karakterizedydi. Sitoplazma dev lipid damlacıklarının yanı sıra yaygın SER vakuolizasyonu, tübüler kristalleri şişkinleşmiş dejeneratif mitokondriyonlar içermekteydi. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bazı tübüllerde varlığını korumaktaydı.

Spermatogonyumlar etkilenmiş tübüllerde büzülmüş ve çevrelerinde düzensiz boşluklar oluşturmuştu. Bazı tübüllerde spermatojenik arrest nedeniyle tübül epitel kalınlığında azalma izlendi (Şekil 34). İmmatür gelişim evrelerine sahip anormal spermatidler seminiferöz tübül lümeninde apoptotik cisimciklerle birlikte izlendi. (Şekil 35).

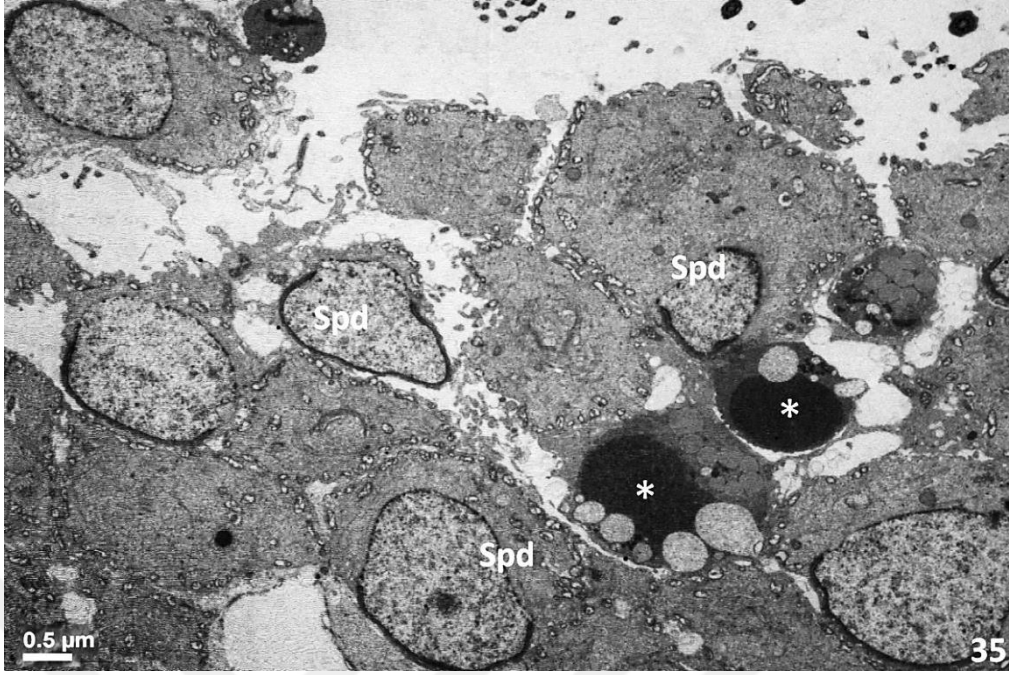
Leydig hücrelerinin, elektron densliği artmış ve sitoplazmalarında dejeneratif mitokondriyonlar görüldü (Şekil 36).



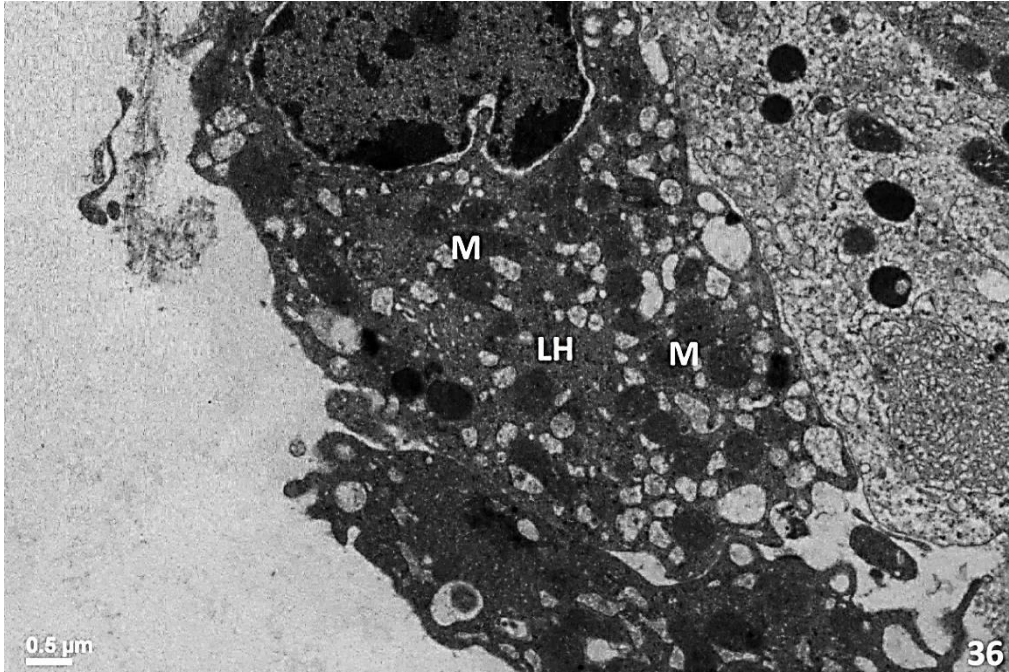
Şekil 33. Grup 3b. Total kalınlığı artmış membrana propria (MP), dev lipid damlacıkları (L) içeren Sertoli hücresi (S), çekirdek (Ç), mitokondriyon (M), sıkı bağlantılar (ok başı) izlenmektedir. Bar=1 µm.



Şekil 34. Grup 3b. Spermatojenik arrest nedeniyle tübül epitel kalınlığında azalma görülmektedir. Sertoli hücresi (S), spermatogonyum (Spg), spermatosit (Spt), spermatid (Spd), membrana propria (MP). Bar=2 µm.



Şekil 35. Grup 3b. Akrozomal anormallikler sergileyen spermadler (Spd) ve apoptotik cisimcikler (*) izlenmektedir. Bar=0,5 µm.



Şekil 36. Grup 3b. Dejeneratif mitokondriyonlarla karakterize Leydig hücresi (LH) izlenmektedir. Bar=0,5 µm.

Grup 3c: Torsiyon/Detorsiyon + Liraglutid Grubu:

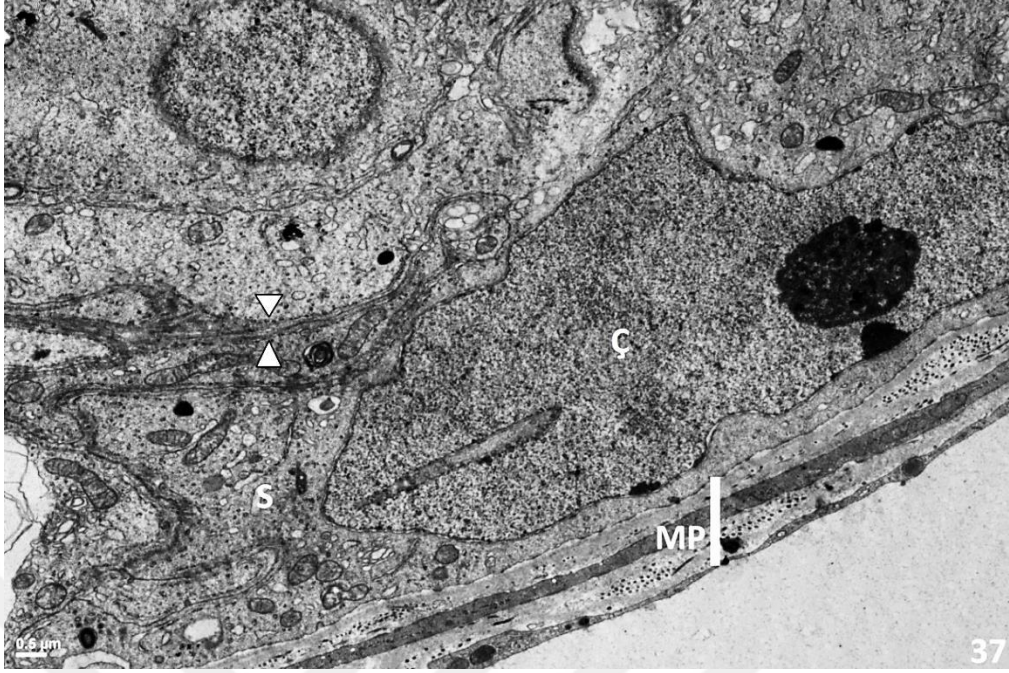
Torsiyon/detorsiyondan sonra 14 gün liraglutid enjekte edilen sıçanların testis doku örnekleri elektron mikroskopla incelendi.

Membrana propria kontrol grubuna benzemektedir (Şekil 37,38).

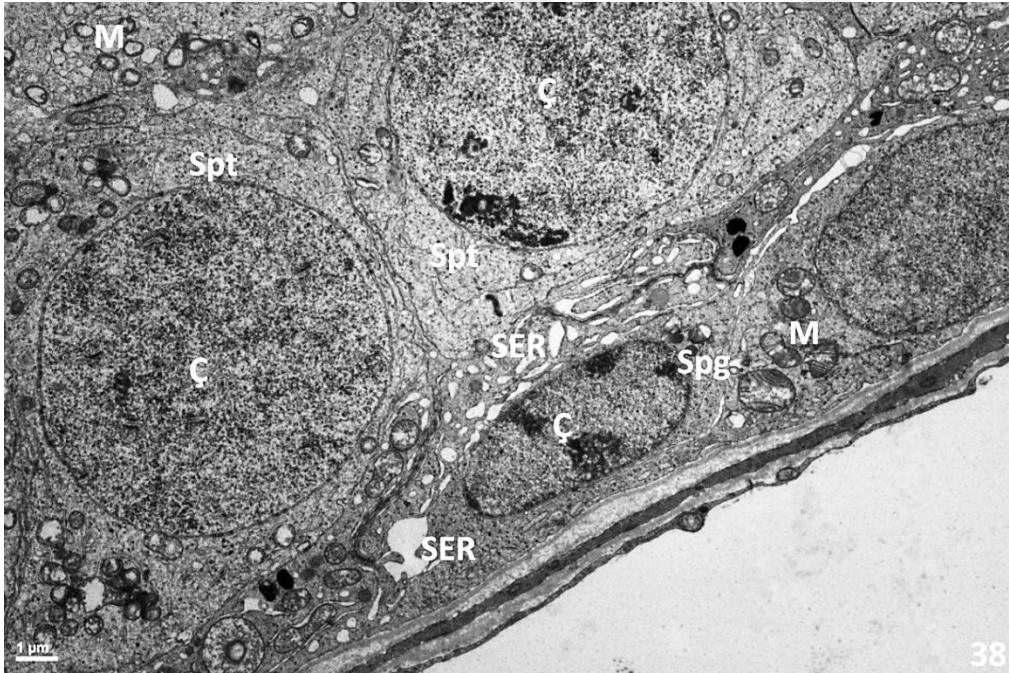
Bazal lamina üzerine oturan belirgin çekirdekçiğe sahip derin invaginasyonlar içeren çekirdekle karakterize Sertoli hücreleri normal elektron denslikte idi. Tübüler mitokondriyonlar, ER sisternaları, glikojen partikülleri içeren sitoplazma kontrol grubuna benzemekle birlikte bazı tübüllerde SER vakuolizasyonu gözlemlendi. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar normal yapılarını korumaktaydı (Şekil 37,38).

Bazal lamina üzerine oturan spermatogonyumlar, kromatin yamalarına sahip oval şekilli çekirdek ve organel yönünden fakir sitoplazmalarıyla kontrol grubuna benzer bir görünüm sergilemekteydi. Bazı tübüllerde sinaptonemal komplekslerinin varlığıyla karakterize normal denslikteki spermatositlerin yanı sıra anormal akrozomal gelişim gösteren çift çekirdekli spermatidler de dikkati çekmekteydi (Şekil 39). Bazı seminiferöz tübüllerin lümeninde immatür hücre birikimi gözlenmekteydi.

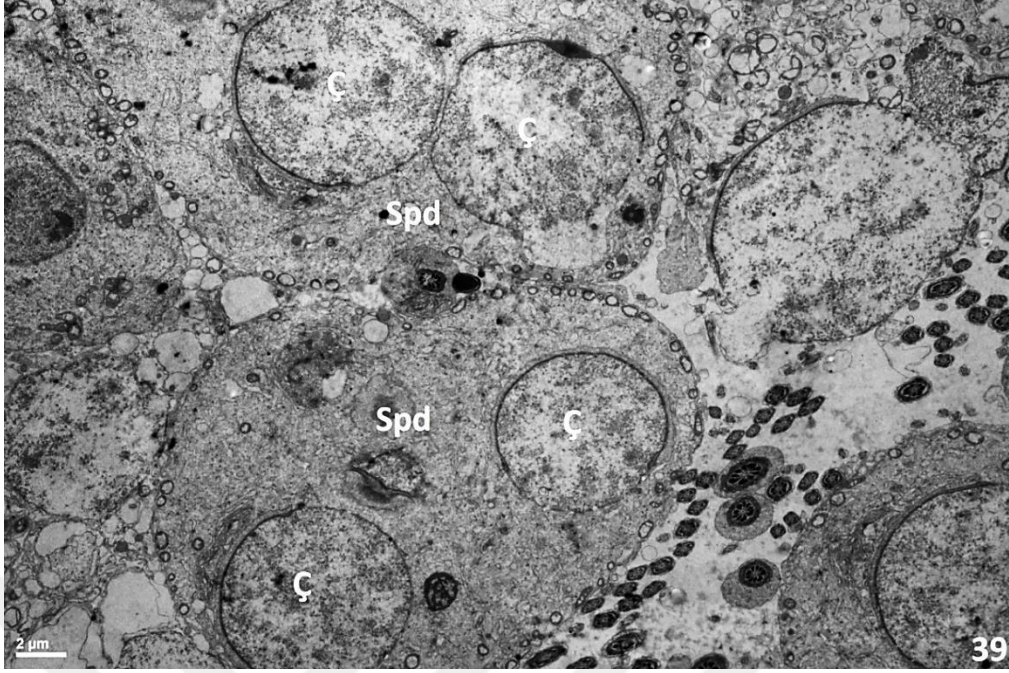
Düzensiz sınırlı heterokromatin yamaları sergileyen çekirdeğe sahip Leydig hücrelerinde sitoplazma, yaygın SER, tübüler kristal mitokondriyonlar, gelişmiş Golgi kompleksi, lipid damlacıkları ve lizozomal yapılar içermekteydi (Şekil 40).



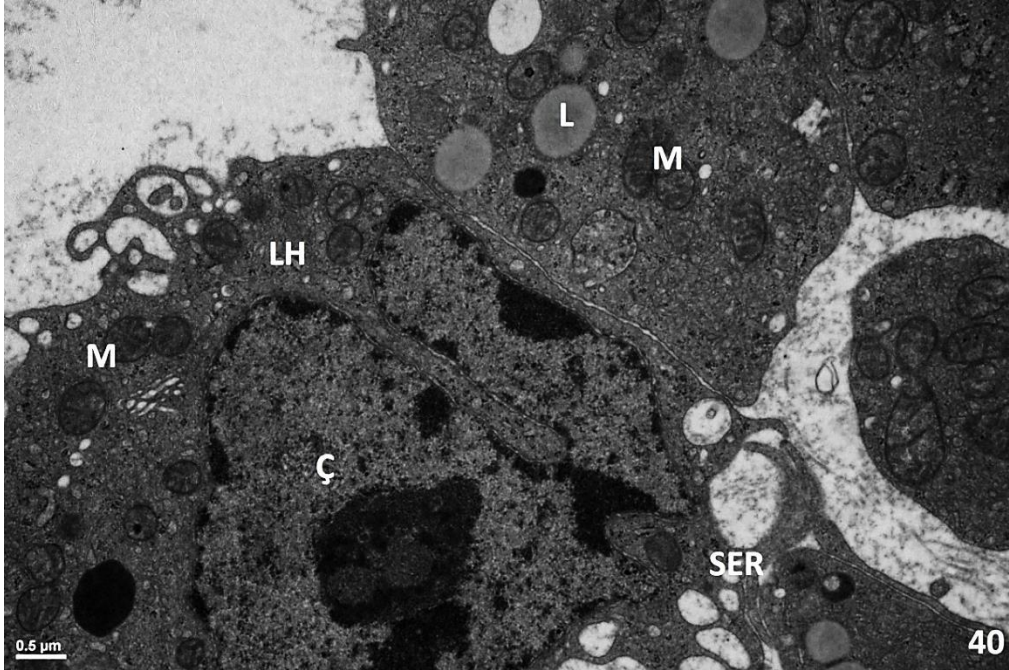
Şekil 37. Grup 3c. Normal elektron denslikteki Sertoli hücresi (S), membrana propria (MP), çekirdek (Ç), mitokondriyon (M), sıkı bağlantılar (ok başı) izlenmektedir. Bar=0,5 µm.



Şekil 38. Grup 3c. Bazal lamina üzerine oturan spermatogonyular (Spg), Sertoli hücrelerinde hafif SER vakuolizasyonu, membrana propria (MP), spermatosit (Spt), çekirdek (Ç), mitokondriyon (M) izlenmektedir. Bar=1 µm.



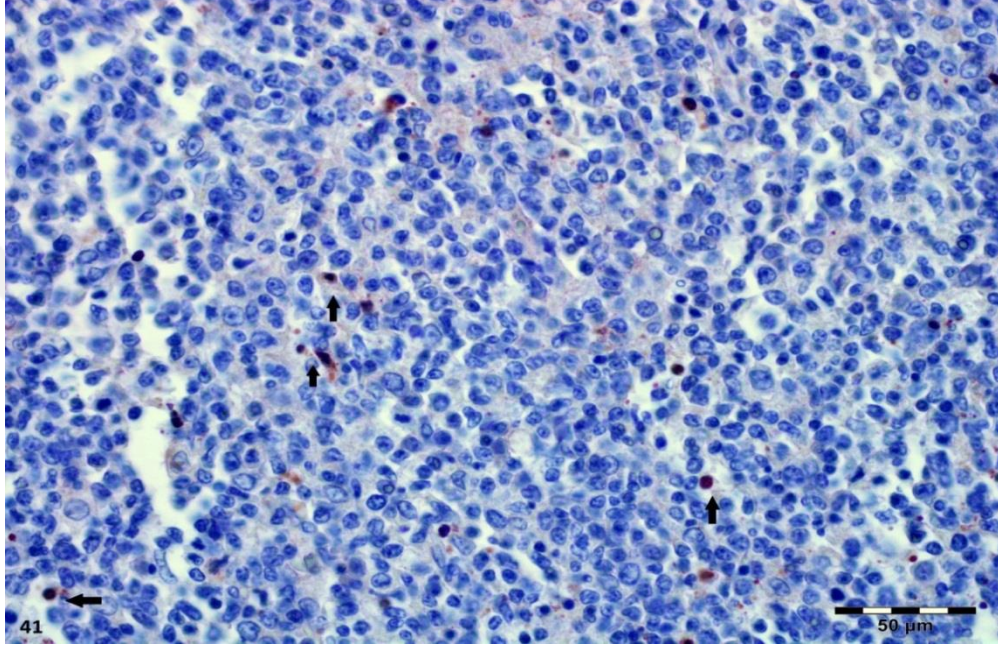
Şekil 39. Grup 3c. Bazı tübüllerde çift çekirdekli (Ç) anormal spermatidler (Spd) izlenmektedir. Bar=2 µm.



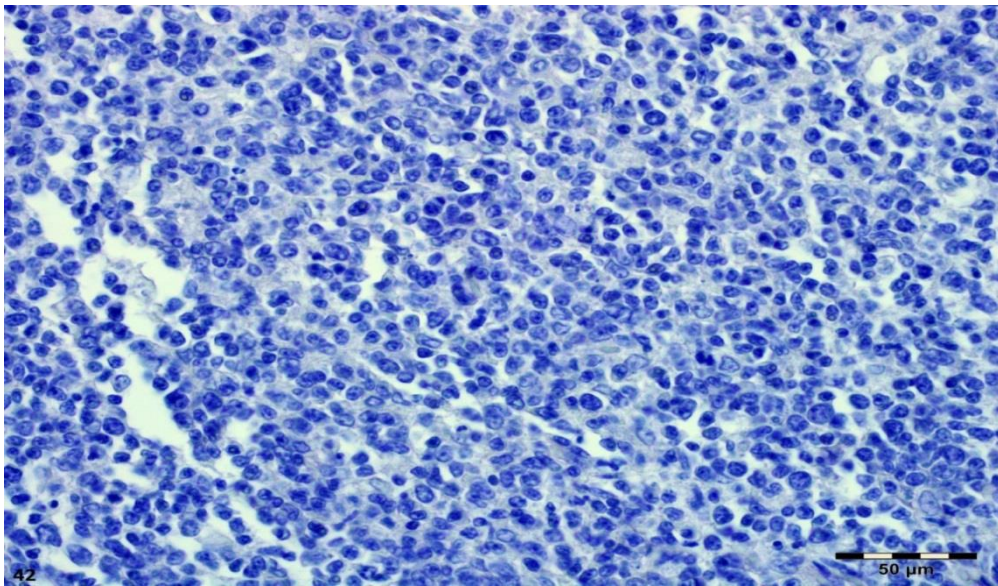
Şekil 40. Grup 3c. Normal elektron denslikte Leydig hücresi (LH). Çekirdek (Ç), mitokondriyon (M), lipid damlacığı (L), agranüler endoplazmik retikulum (SER) izlenmektedir. Bar= 0,5 µm

4.3. İmmünohistokimya Bulguları

Kaspaz-3 immünoaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanılmıştır (Şekil 41). Ayrıca primer antikor damlatılmayan tonsilla palatina kesiti negatif kontrol amacıyla boyanmıştır (Şekil 42).



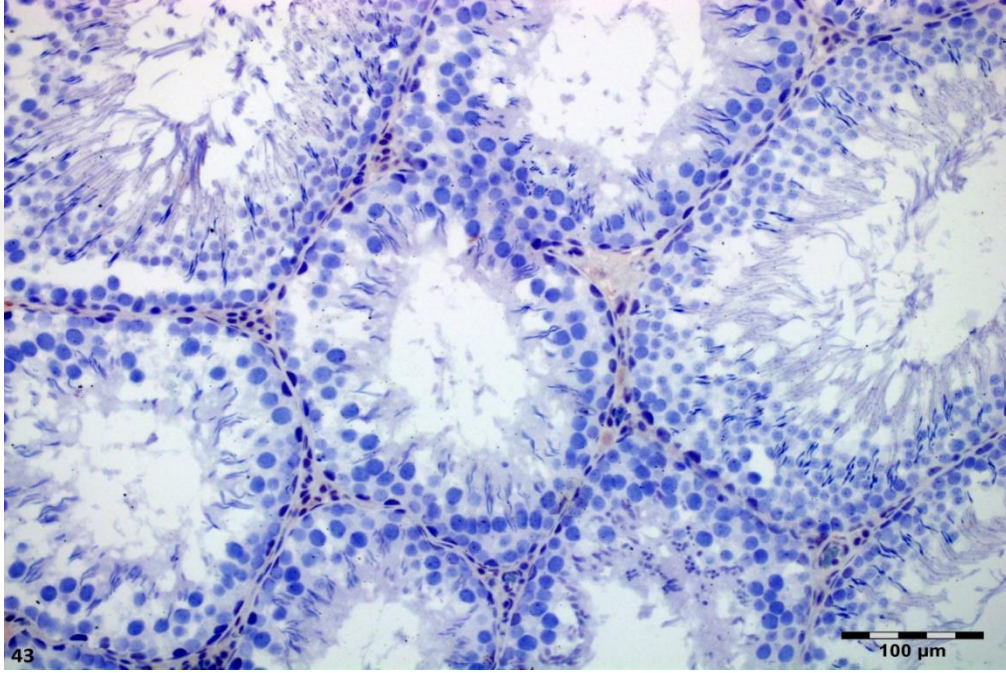
Şekil 41. Tonsilla palatina (Pozitif kontrol). Kaspaz-3 immünoaktivitesinin görüldüğü izlendi (ok). Bar= 50 µm



Şekil 42. Tonsilla palatina (Negatif kontrol). Kaspaz-3 immünoaktivitesinin görülmediği izlendi. Bar= 50 µm

4.3.1. Grup 1: Kontrol grubu

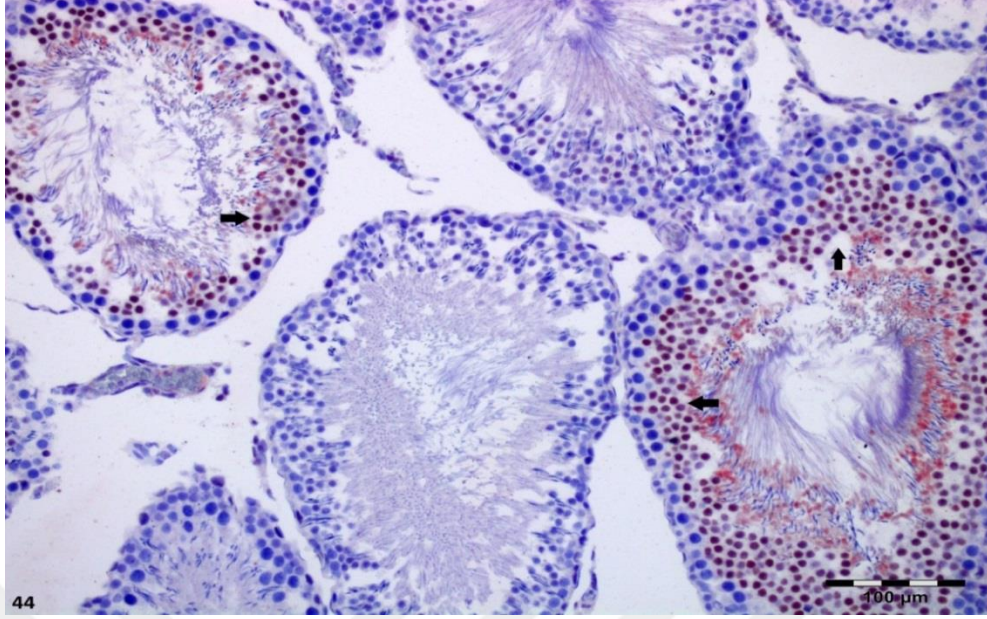
Normal laboratuvar şartlarında yaşatılan sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinde kaspaz-3 ekspresyonlarını göstermek amacıyla immünohistokimyasal yöntemler uygulandı. Bu gruba ait testis kesitleri incelendiğinde kaspaz-3 ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu görüldü.



Şekil 43. Kontrol grubu. Kaspaz -3 immünreaktivitesi minimal düzeyde izlendi. Bar=100 µm.

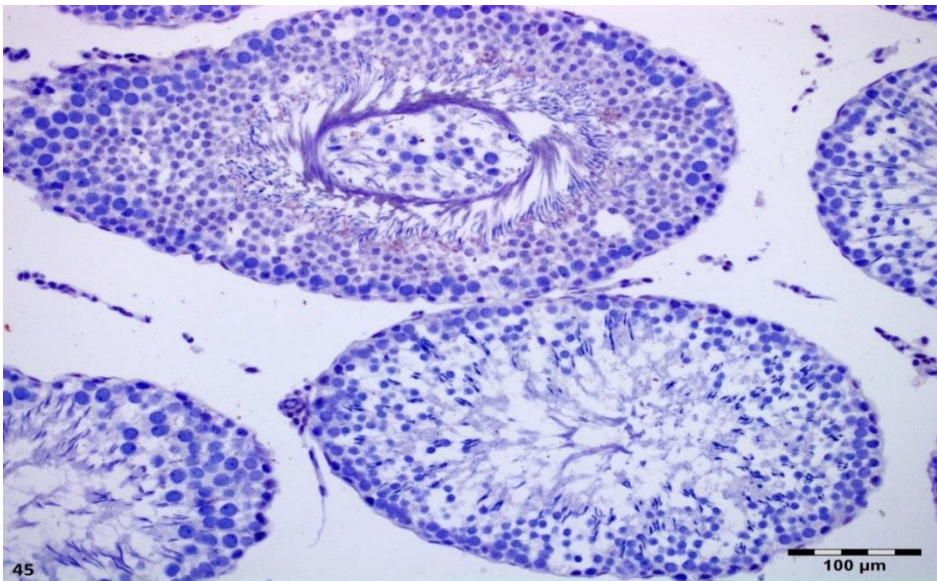
4.3.2. Grup 2

Grup 2a: Diyabet Grubu: İntraperitoneal olarak 50 mg/kg streptozosin uygulanan ve 72 saat sonra diyabetik olan sıçanların testis doku örnekleri, kaspaz-3 ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. Seminiferöz tübüllerde, membrana propriaya ilişkili olan Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlarda kaspaz-3 ekspresyonunun olmadığı görülürken, bazı tübüllerde özellikle post mayotik aşamadaki spermatidlerde kaspaz-3 ekspresyonunun yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 44).



Şekil 44. Grup 2a. Kaspaz-3 immünreaktivitesi (ok) yoğun görülmektedir. Bar=100 µm.

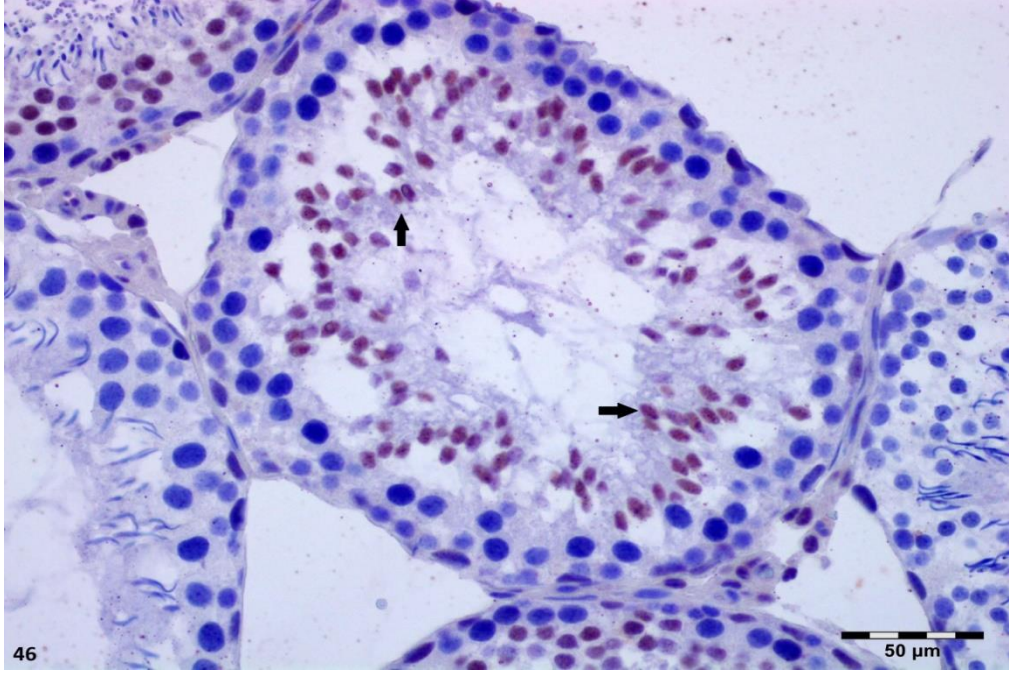
Grup 2b): Diyabet + Liraglutid Grubu: Diyabet oluşturulduktan sonra 14 gün boyunca günde 2 kez 0,3 mg/kg'lık subkutan liraglutid enjeksiyonu yapılan sıçanların testis doku örnekleri, kaspaz-3 ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi. Kaspaz-3 ekspresyonun kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 45).



Şekil 45. Grup 2b. Kaspaz -3 immünreaktivitesi minimal düzeyde izlenmektedir. Bar=100 µm.

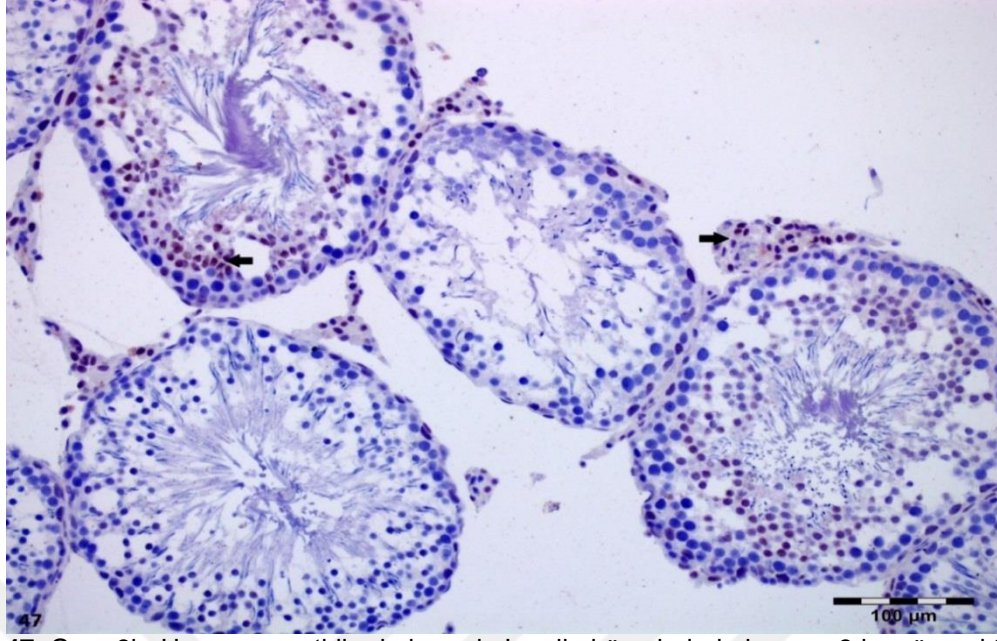
4.3.3. Grup 3a

Grup 3a: Torsiyon Grubu: 3 saatlik torsiyondan sonra sakrifiye edilen sıçanların testis doku örnekleri, kaspaz-3 ekspresyonu gösterilmek amacıyla immünohistokimyasal olarak incelemeye alındı. Spermatidlerde belirgin bir şekilde kaspaz -3 ekspresyonunun olduğu gözlemlendi (Şekil 46).



Şekil 46. Grup 3a. Kaspaz-3 immünreaktivitesinin yoğun olduğu izlenmektedir. Bar=50 µm.

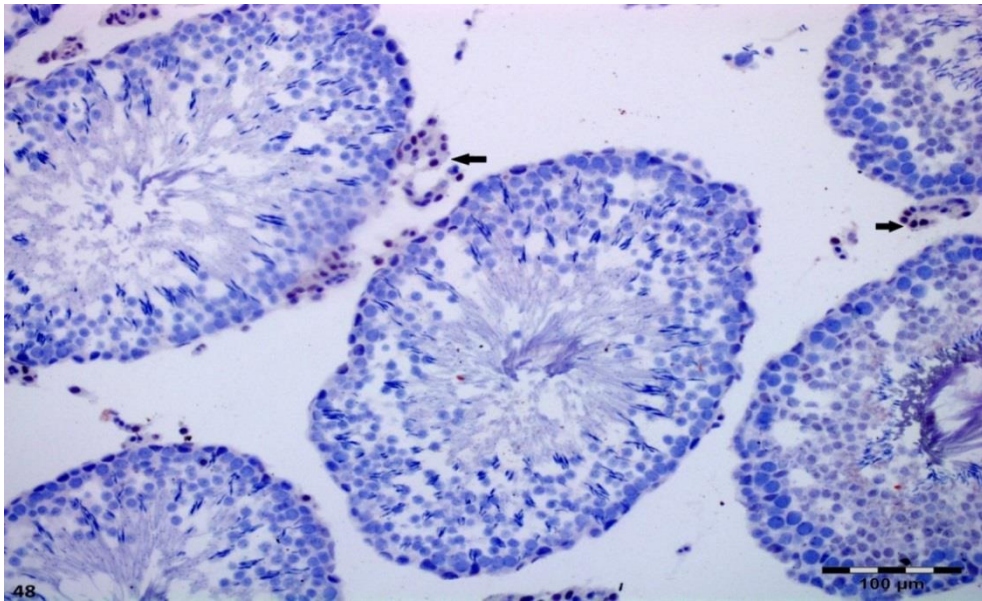
Grup 3b: Torsiyon/Detorsiyon Grubu: Torsiyondan 3 saat sonra detorsiyon yapılan ve 14 gün yaşatılan sıçanlardan elde edilen testis doku örnekleri, kaspaz-3 ekspresyonunu göstermek amacıyla immünohistokimyasal yöntemlerle hazırlanarak incelendi. Birçok tübülde spermatidlerde ve bunların yanı sıra interstisyumdaki Leydig hücrelerinde de kaspaz-3 ekspresyonu dikkati çekti (Şekil 47).



Şekil 47. Grup 3b. Hem spermatidlerde hem de Leydig hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesi (ok) görülmektedir. Bar=100 µm.

Grup 3c. Torsiyon/Detorsiyon + Liraglutid Grubu:

Torsiyon/detorsiyondan sonra 14 gün liraglutid enjekte edilen sıçanların testis doku örnekleri alınarak kaspaz-3 immünreaktivitesine bakıldı. Çoğu tübüllerde kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı ancak Leydig hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda ekspresyonun olduğu görülmektedir (Şekil 48).



Şekil 48. Grup 3c. Leydig hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu (ok) görülmektedir. Bar=100 µm.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Deney sonunda anestezi altındaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde, oksidatif hasarı belirlemek için antioksidan savunma sistemi enzimlerinden SOD ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA düzeyleri ölçülmüştür. Aynı zamanda alınan kan örneklerinin testosteron seviyelerine de bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Mann-Whitney Test ile değerlendirilmiştir.

Deneklerden elde edilen bu veriler kontrol grubuyla kıyaslandığında MDA değerlerinin diyabet, torsiyon, torsiyon/detorsiyon gruplarında anlamlı olarak artış gösterdiği ($p < 0,05$) ancak diyabet+liraglutid ile torsiyon/detorsiyon+liraglutid gruplarında anlamlı bir fark göstermediği gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Aynı şekilde SOD değerleri incelendiğinde diyabet, torsiyon, torsiyon/detorsiyon gruplarında anlamlı bir azalma gözlenirken ($p < 0,05$), diyabet+liraglutid ile torsiyon/detorsiyon+liraglutid gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 5).

Testosteron değerleri de kontrol grubuyla kıyaslandığında diyabet, torsiyon, torsiyon/detorsiyon gruplarındaki testosteron seviyesinin düşük olduğu, diyabet+liraglutid ile torsiyon/detorsiyon+liraglutid gruplarında ise anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 6).

Çizelge 5. Serum MDA, SOD ortalama değerleri

Ortalama		MDA(nmol/ml)	SOD (% İnhibisyon Oranı)
Grup 1	K	5,2 ± 2,7	74,9 ± 6,9
Grup 2	D	10,72 ± 2,4 ^a	62,7 ± 5,4 ^a
	D+L	7,13 ± 2,2 ^b	69,3 ± 3,3 ^b
Grup 3	T	8,3 ± 1,17 ^a	68,2 ± 3,4 ^a
	T/D	10,23 ± 2,2 ^a	64,8 ± 3,3 ^a
	T/D+L	6,98 ± 0,12 ^b	70,1 ± 4,02 ^b

^a: $p < 0,05$ kontrole kıyasla anlamlı

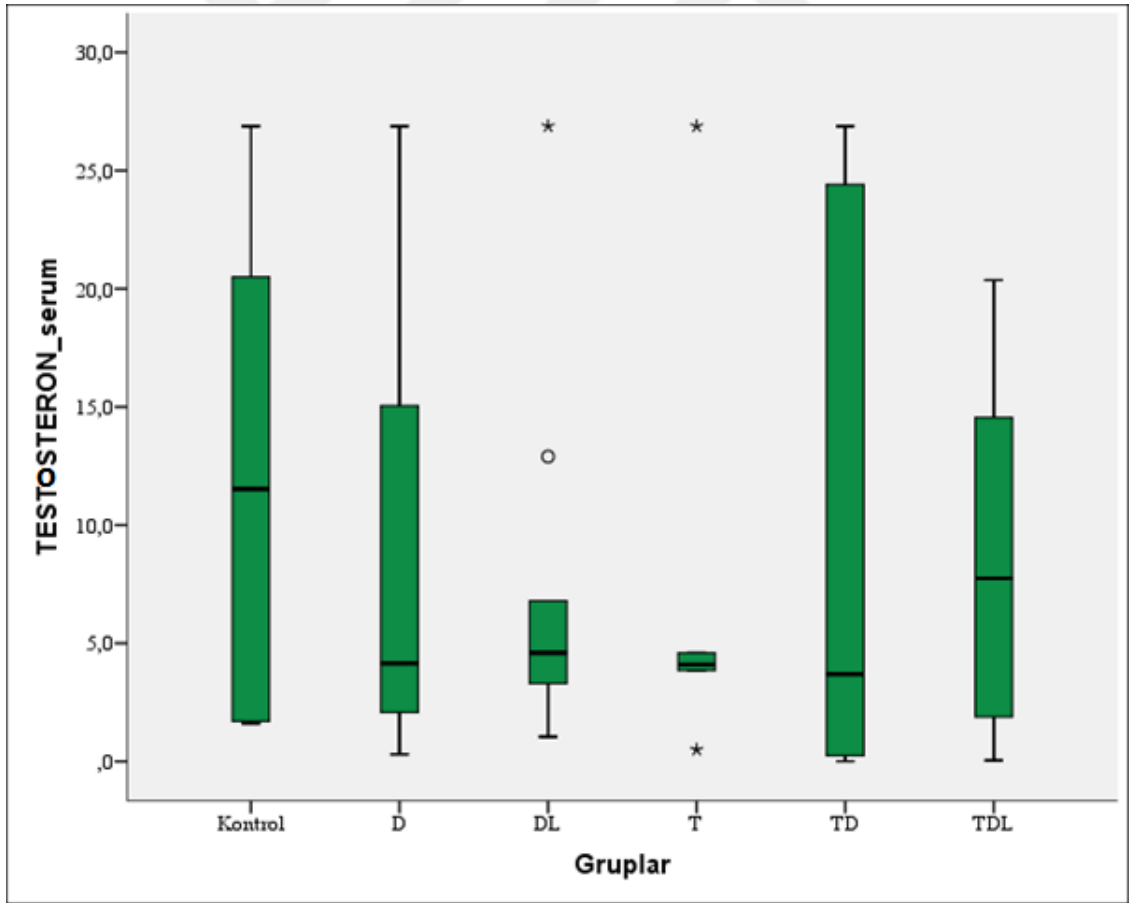
^b: $p > 0,05$ kontrole kıyasla anlamsız

Çizelge 6. Serum testosteron ortalama değerleri

Ortalama		Testosteron (ng/ml)
Grup 1	K	11,7 ± 1,12
Grup 2	D	4,7 ± 0,2 ^a
	D+L	5,2 ± 1,8 ^a
Grup 3	T	4,3 ± 1,2 ^a
	T/D	3,8 ± 1,2 ^a
	T/D+L	8,8 ± 0,2 ^a

^ap< 0,05 kontrole kıyasla anlamlı

^bp>0,05 kontrole kıyasla anlamsız



Şekil 49. Serum testosteron grafiği

5. TARTIŞMA

Günümüzde çeşitli hastalıkların testisin yapı ve fonksiyonu üzerine etkilerini açıklayan pek çok çalışma bulunmaktadır^{66,81,83,84,85}. Beslenme⁶⁶, sigara⁸⁶, alkol⁸⁷, toksik ajanlar^{88,89}, hipertermi⁶⁶, genetik⁹⁰, metabolik hastalıklar^{81,84} ve radyasyonun⁹¹ yanı sıra, iskemi-reperfüzyon hasarı da testiküler morfolojiyi etkilemektedir^{66,92,17,93,94}.

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan diyabet ve iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında liraglutidin testiküler morfoloji üzerine etkileri, ışık ve elektron mikroskopi, immünohistokimyasal ve biyokimyasal teknikler kullanarak araştırıldı. Çalışmamız diyabet tedavisinde etkin olarak kullanılan GLP-1 agonisti olan liraglutidin testis üzerine etkilerini ortaya koyan ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Diyabet, akut ve kronik komplikasyonlara neden olabilen sistemik bir hastalıktır. Hastalıkta hiperglisemi kontrol altına alınmazsa morbidite ve erken mortalite riski artar. Diyabet, günümüze kadar çeşitli doku ve organlarda çalışılmış ve yol açtığı dejeneratif değişiklikler birçok çalışmada rapor edilmiştir^{33,37,95,96,97}. Son yıllarda diyabet, erkeklerde infertilite sebeplerinden biri olarak değerlendirilmektedir⁷⁶. Diyabet vücutta pek çok sinyal yolağını etkileyerek oksidatif strese yol açmakta ve bu durum erkek üreme sistemi organlarında yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olmaktadır. Oksidatif stresin erkeklerde hipotalamo-hipofizyal gonadal sistem üzerine olumsuz etkileri sonucu testis morfolojisi bozular. Testiküler hasar; seminiferöz tübüllerde atrofi, spermatojenik hücre kaybı, spermatidlerde anomaliler, çok çekirdekli dev hücre formu, lümeninde immatür hücre birikimi gibi çeşitli dejeneratif değişikliklerle karakterizedir^{17,81,84,98,99}. Yapılan deneysel çalışmalarda diyabetik sıçanlarda oksidatif stresin, sperm sayısında azalmaya, spermatogenezde gecikmeye ve testiküler DNA hasarını indükleyerek infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir⁸³.

Çalışmamızda, diyabet oluşturduğumuz gruplarda, seminiferöz tübül lümeninde immatür hücre birikiminin (Şekil 12-13) varlığı dikkati çekmekteydi. Membrana proprianın ince yapı düzeyinde nispeten normal olduğu ancak Sertoli hücrelerinin nispeten elektron dens hale geldiği ve sitoplazmalarında dev lipid

damlacıkları ile SER vakuolizasyonu içerdği gözlemlendi. Ayrıca spermatojenik hücrelerde özellikle akrozomal faz spermatidlerde akrozomal kılıfta düzensizlikler izlendi (Şekil 24,24a,25). Normal çekirdek yapısına sahip Leydig hücrelerinin sitoplazmasında, mitokondriyal dejenerasyon ve SER vakuolizasyonu izlenmekteydi (Şekil 26). Diyabet oluşturulan grup ile karşılaştırıldığında, diyabet sonrası liraglutid uygulanan grupta seminiferöz tübüllerin nispeten normal yapısını korumuş olduğu, bunun yanı sıra bazı seminiferöz tübüllerin diyabet grubuna benzer olarak dejeneratif değişiklikler gösterdiği görüldü (Şekil 14-15). Liraglutid uygulanan grubun elektron mikroskopik incelenmesinde diyabet grubuna benzer olarak Sertoli hücrelerinin elektron dens hale geldiği, hücre çekirdeğinde derin invaginasyonların olduğu izlenirken, bazı tübüllerde çift çekirdekli anormal spermatidler, lümende immatür, fagositotik ve apoptotik hücreler dikkati çekti (Şekil 27,28,28a). Bazı Leydig hücrelerinde dejeneratif değişiklikler sergileyen mitokondriyonlar ve azalmış lipid damlacıkları izlendi (Şekil 29).

Nitekim Köroğlu ve arkadaşlarının STZ ile indükledikleri sıçanlarla yaptıkları çalışma da bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu araştırmacılar diyabet oluşturdukları sıçanlardan elde ettikleri testis dokularında, spermatojenik hücrelerde dejenerasyon, akrozomal hasar, spermatozoonların kuyruk yapılarında bozulma, tübül duvarında kalınlaşma ve germ hücrelerinde azalmanın yanısıra Sertoli hücrelerinde de dejeneratif değişikliklerin varlığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar diyabet oluşturulan sıçanlara antioksidan özelliği olan oksitosin tedavisi uyguladıktan sonra testiste seminiferöz tübüllerin sağlam kontrole yakın bir şekilde korunmuş olduğunu rapor etmişlerdir⁹⁹.

Fontoura ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları, obezite nedeniyle uzun süreli liraglutid kullanım öyküsü olan hastanın sperm sayısındaki azalmayı gösterdikleri vaka raporu¹⁰⁰ dışında, liraglutidin testis üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamızda liraglutid uyguladığımız diyabet grubunda ışık mikroskopik düzeyde bazı tübüllerde immatür hücre birikimi görülmesine karşın kontrol grubuna yakın bir düzelme izlendi. Ancak elektron mikroskopik değerlendirmelerimizde, Fontoura ve arkadaşlarının vaka raporuna benzer olarak liraglutid tedavisi uygulanan grupta bazı seminiferöz

tübüllerin diyabet grubuna benzer olarak dejeneratif değişiklikler gösterdiği dikkati çekti.

Inoue ve arkadaşları, streptozotosin (STZ) ile indüklenen ve Tip 1 diyabet oluşturulan sıçan modelinde liraglutidin kalpte, 5' AMP-aktive protein kinaz (AMPK)-Sirt1 yolağının aktivasyonu ile oksidatif stres ve apoptoza karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir³³. Çalışmamızda da liraglutidin muhtemelen benzer yolak üzerinden antioksidan ve antiapoptotik etki göstererek, testiste kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı, MDA seviyesini azaltıp, SOD seviyesini arttırdığı ve bu yolla antiapoptotik ve antioksidatif etkilere neden olduğu söylenebilir.

İskemi-reperfüzyon hasarına yol açan mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. İskemik doku hasarının esas kaynağının serbest oksijen radikalleri olduğu bilinmektedir. Serbest oksijen radikalleri, iskeminin şiddetine bağlı olarak çeşitli düzeylerde hücrel hasara yol açmaktadır. Bu hasarda hücre ve organellerin membranları, DNA ve enzimler etkilenmektedir^{66,101,102,103,104}. İskemide serbest radikallerin bu derecede önem kazanması araştırmacıları, değişik dokularda iskemi ve serbest radikal metabolizmasının araştırıldığı çalışmalara yönlendirmiştir^{102,105,106}.

İskemiyeye maruz kalan organlarda dolaşımın yetersiz olması oksidatif stresi tetikleyerek hasar meydana getirmektedir. Literatürde iskeminin, vazodilatasyonu azalmış damarlarda lökositlerin damarlara yapışmasına ve bunun sonucunda kapillerlerde tıkanmaya neden olduğu rapor edilmiştir^{106,107,108,109}. Ancak iskemiye ortadan kaldırmak için uygulanan reperfüzyonun ise iskemiden daha ciddi doku hasarına neden olduğu öne sürülmüştür. Gerçekten de Aruna Devi ve arkadaşlarının yapmış olduğu deneysel serebral iskemi-reperfüzyon modelinde, lipid, protein ve DNA hasarı oluşturan reaktif moleküllerin üretiminin uyarıldığı ileri sürülmüştür¹¹⁰. Çalışmamızdaki torsiyon grubunda ışık mikroskopik düzeyde seminiferöz tübüllerde dejenerasyon, apoptoz ve artmış hemoraji gözlemlendi (Şekil 16,17). Elektron mikroskopta membrana propria total kalınlığında artış, elektron dens Sertoli hücrelerinde yaygın SER vakuolizasyonu, dev lipid damlacıkları, dejeneratif mitokondriyonlar ve sıkı bağlantılarda bozulma izlendi (Şekil 30).

Seminiferöz tübüllerde apoptotik ve litik değişiklikler gösteren spermatojenik hücreler ile anormal spermatidlerin yanı sıra hemorajik alanların varlığı dikkat çekiciydi (Şekil 30,31). Leydig hücrelerinde ise artan elektron densliğe eşlik eden SER vakuolizasyonu, dejeneratif mitokondriyonların yanısıra lipid damlacıklarında azalma gözlemlendi (Şekil 32). Torsiyon/detorsiyon grubunda ise membrana propria total kalınlığının aşırı derecede artmış olduğu, bazal laminanın son derece düzensiz ve kıvrıntılı olduğu (Şekil 33), Sertoli hücrelerinin torsiyon uygulanan gruba benzediği izlendi. Spermatojenik arrest nedeniyle tübül epitelinin kalınlığında azalma (Şekil 34) ile birlikte, immatür anormal spermatidlerin ve apoptotik cisimciklerin seminiferöz tübülde artmış olduğu dikkati çekti (Şekil 35). Toksik ajanlara karşı membrana propria total kalınlığının artması seminiferöz tübül epitelini koruyucu bir reaksiyondur. Yine Sertoli hücrelerinin elektron dens hale gelmesi ilk reaksiyon olarak değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalarda I/R hasarında bulgularımızı destekler nitelikte, membrana propria ve seminiferöz tübül epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler rapor edilmiştir^{93,111,112,113,114,115,116,117,118}. Nitekim Taati ve arkadaşları, T/D yaptıkları sıçanlara antioksidan özelliği olan ghrelin uygulayarak karşılaştırmalı bir çalışma yapmışlardır. T/D grubunda, germinal epitel dejenerasyonu, seminiferöz tübül ve interstisyumda ödem, hiyalinizasyon, membrana propriada kalınlaşma göstermişlerdir. Ghrelin uyguladıktan sonra bu bulgulardaki iyileşmeyi rapor etmişlerdir¹¹³.

Liraglutid uyguladığımız T/D grubunda ışık ve elektron mikroskopik bulgularımızın kontrol grubuna benzediği gözlemlendi (Şekil 37,38,39,40). Bu sonuçlarımızda çift çekirdekli spermatidlerde artış olması dikkat çekiciydi (Şekil 39). Liraglutid uygulanan diyabet, torsiyon/detorsiyon gruplarımızın ışık ve elektron mikroskopik değerlendirilmesinde, liraglutidin testis yapısı üzerine minimal de olsa olumlu etkileri olduğu ileri sürülebilir. Bununla beraber liraglutidin çok çekirdekli dev hücre oluşumunu tetikleyici bir özelliğe sahip olabileceği de öne sürülebilir.

Diyabet ve iskemi reperfüzyon hasarında testiste MDA ve SOD seviyelerindeki değişiklikler antioksidan savunma mekanizmalarının etkisiz olduğunun bir göstergesidir^{81,84,99,114,116,119,120,121,123,124}. Pek çok çalışmada

reperfüzyon sonucunda oksijen radikallerinin arttığı, bu sebeple doğal antioksidan savunma mekanizmasının bozulduğu ve reperfüzyonu sağlanan organ başta olmak üzere oksidatif yükün arttığı gösterilmiştir^{17,36,85,105,112,116,114,122,123,124}.

Çalışmamızda diyabet ve diyabet+liraglutid gruplarının biyokimyasal bulguları kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Diyabette MDA değerinin arttığı, SOD değerlerinin ve testosteron seviyelerinin azalmış olduğu gözlemlendi. Liraglutid grubunda ise, kontrol grubuna benzer olarak, MDA değerlerinin azalmış olduğu, SOD değerlerinin ve testosteron seviyelerinin anlamlı olarak artmış olduğu dikkati çekti (Çizelge 5-6, Şekil 49). Grup 3'ten elde ettiğimiz kan örneklerinde liraglutid uygulanmayanlar gruplarında MDA düzeylerinin yüksek, SOD ve testosteron düzeylerinin düşük olduğu, liraglutid uygulanan gruplarda ise MDA düzeylerinin azaldığı, SOD ve testosteron seviyesinin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Bu bulgular ışığında liraglutidin diyabet ve iskemi-reperfüzyon hasarında literatürle uyumlu olarak olumlu etkileri olduğu öne sürülebilir^{13,21,35,36,125,126,127}.

Çalışmamızda spermatojenik hücrelerde ve Leydig hücrelerinde apoptozunun belirlenmesi amacıyla kaspaz-3 immünoaktivitesi değerlendirildi. Diyabet grubunda Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlarda kaspaz-3 ekspresyonunun olmadığı, post mayotik spermatidlerde ekspresyonun yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 44). Liraglutid uyguladığımız diyabet grubunda kontrol grubuna benzer olarak Leydig hücreleri ve spermatojenik hücrelerde kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmedi (Şekil 45). Torsiyon grubunda da diyabette olduğu gibi spermatidlerde belirgin kaspaz-3 ekspresyonu görüldü (Şekil 46). Ancak torsiyon/detorsiyon grubunda spermatidler dışında Leydig hücrelerinde de kaspaz-3 ekspresyonu dikkati çekti (Şekil 47). Torsiyon/detorsiyon sonrası liraglutid uygulanan grupta ise azalmış kaspaz-3 ekspresyonu dikkati çekti (Şekil 48). Kanter ve arkadaşları yaptıkları çalışmada quercetin'in diyabetik sıçan testisinde apoptotik sürece etkilerini araştırmışlar ve bizim bulgularımıza benzer sonuçlar rapor etmişlerdir¹⁷.

Çalışmamızda kullandığımız liraglutid, diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan GLP-1'in agonistidir. Nöral aktivitenin düzenlenmesinde merkezi rol

oynayan ve nöron koruyucu etkileri olan GLP-1, serebral iskemi modelinde de çalışılmış ve anti-apoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-xl'in ekspresyonlarını arttırdığı öne sürülmüştür³⁶. Liraglutidin, sıçanlarda, kan-beyin bariyerini geçtiği ve nöroprotektif etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda Alzheimer hastalığında (AD) amiloid plak birikiminde azalmaya neden olduğu ve algısal fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir^{36,123,126,127,128}. Bundan başka Tomoaki ve arkadaşları diyabetik ratlarda liraglutidin kalp yağlanmasını önlediğini, Bax ve kaspaz-3 seviyesini düşürdüğünü, Bcl-2 seviyesini arttırdığını rapor etmişlerdir³³. Ayrıca T/D hasarında kaspaz-3, kaspaz-8 ve PARP-1 ekspresyonlarının arttığı⁹⁴, iskemide yuvarlak spermatidlerde, uzamış spermatidlerde ve spermatozoidlerde güçlü kaspaz-3 ekspresyonunun gözlemlendiği belirtilmiştir¹¹¹. Çalışmamızda diyabet ve torsiyon/detorsiyon gruplarında kaspaz-3 ekspresyonunun belirgin olarak artması, buna karşın tedavi gruplarında anlamlı olarak azalması, liraglutidin testiste anti-apoptotik etkisinin bir sonucu olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak sıçanlarda deneysel diyabet ve torsiyon/detorsiyon modelinde testis üzerine GLP-1 agonisti olan liraglutidin antidiyabetik, antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, bu ajanın diyabet ve torsiyon/detorsiyon gruplarında meydana gelen yapısal değişiklikler ile hormon seviyeleri üzerine olumlu etkilerinin, uzun süreli kullanımda daha etkin olabileceği düşünüldü. Liraglutidin, testise etkileri ile ilgili ileri araştırmaların yapılması ve buna yönelik bilgilerin artmasıyla, gelecekte diyabet hastalarında ve/veya torsiyon/detorsiyon vakalarında, testis yapısı ve fonksiyonunun korunmasında, alternatif bir tedavi ajanı olabileceği kanaatine varıldı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneysel olarak oluşturulan diyabetli ve iskemi/reperfüzyonlu sıçan testislerinde liraglutidin etkisinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği bu çalışmanın sonucunda;

1. Diyabet oluşturulan grubumuzda ışık mikroskopik düzeyde membrana propriada düzensizlikler ve interstisyumda ödem izlendi. Normal görünümünü seminiferöz tübüllerin yanı sıra hiyalinizasyon ve vakuolizasyon gösteren tübüllerin varlığı dikkati çekti. Dejenere seminiferöz tübüllerin lümeninde immatür hücre birikimine de rastlanıldı.
2. Liraglutid uyguladığımız diyabet grubumuzda ışık mikroskopik olarak membrana propria daha düzeli görünümdeydi. Nispeten normale yakın seminiferöz tübüller ve hafif ödemli interstisyum izlendi. Ancak bazı tübüllerde immatür hücre birikiminin devam ettiği görüldü.
3. Torsiyon grubumuzda ışık mikroskopik düzeyde seminiferöz tübüllerin hemen hemen hepsinin dejeneratif olduğu görüldü. Tübül lümeninde çok çekirdekli dev hücreler ve apoptotik cisimcikler belirlendi. İnterstisyum ödemli ve hemorajik görünümdeydi.
4. Torsiyon/Detorsiyon grubumuzda ışık mikroskopik olarak seminiferöz tübüllerin çoğu torsiyon grubuna benzer nitelikteydi. Tübül lümeninde çok çekirdekli dev hücreler ve apoptotik cisimcikler gözlenmekteydi. İnterstisyumda yaygın ödem ve inflamasyon izlendi.
5. Liraglutid uyguladığımız torsiyon/detorsiyon grubumuzda ışık mikroskopik olarak nispeten normal seminiferöz tübüllerin varlığı izlendi. seminiferöz tübüllerde dökülmenin azaldığı, immatür hücre birikiminin gözlenmediği farkedildi. İnterstisyumda hafif ödemin devam ettiği görüldü.
6. Elektron mikroskopik düzeyde diyabet grubumuzda Sertoli hücrelerinin elektron yoğunluğunun arttığı belirlendi. Sitoplazmalarında lizozomal yapılar, dev lipid damlacıkları, SER vakuolizasyonu, şişkin mitokondriyonlar

izlendi. Bazı tübüllerde akrozomal fazdaki spermatidlerde akrozomal kılıfta yer yer bozulmalar dikkati çekti. Leydig hücreleri normal çekirdek yapısına sahipti ve sitoplazmasında, mitokondriyal dejenerasyon ve SER vakuolizasyonu izlendi. Liraglutid uyguladığımız diyabet grubumuzda spermatogenez sürecini yansıtan spermatozoitler, normal elektron denslikte izlendi. Sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı spermatojenik hücrelerin yanı sıra bazal laminaya kadar sokulan spermatidler dikkati çekti. Bazı tübüllerde çift çekirdekli spermatidler görüldü. Normal elektron densliğe sahip Leydig hücreleri izlendi.

7. Elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde, torsiyon grubumuzda membrana propria'nın kalınlığı artmıştı. Hücresel bütünlüğü bozulmuş Sertoli hücresinde, yaygın SER vakuolizasyonun yanı sıra dev lipid damlacıkları, dejeneratif mitokondriyonlar görüldü. Spermatogonyumların büzüştüğü, spermatojenik hücrelerin apoptotik ve dejeneratif değişiklikler gösterdiği izlendi. Leydig hücreleri elektron dens hale gelmişti.
8. Elektron mikroskopik olarak torsiyon/detorsiyon grubumuzda membrana propria kalınlığının son derece arttığı dikkati çekti. Sertoli hücreleri; düzensiz sınırlı çekirdekleri ve sitoplazmalarındaki dev lipid damlacıkları, şişkin dejeneratif mitokondriyonları ile izlendi. Spermatogonyumlar büzüşmüş, bazı spermatidler membrana propria'ya kadar sokulmuştu.
9. Elektron mikroskopik seviyede liraglutid uyguladığımız torsiyon/detorsiyon grubumuzda membrana propria kontrol grubuna benzemektedir. Sertoli hücreleri normal elektron denslikteydi. Normal spermatojenik hücrelerin yanı sıra çift çekirdekli spermatidlerin varlığı dikkati çekti.
10. Diyabet, torsiyon, torsiyon/detorsiyon gruplarımızın hepsinde kaspaz-3 immün reaktivitesi yoğun olarak gözlenirken, liraglutid uygulanan gruplarımız kontrol grubuna benzer nitelikteydi.
11. Diyabet, torsiyon, torsiyon/detorsiyon gruplarında serum MDA ve SOD düzeyleri; kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklılık göstermekteydi. Serum testosteron düzeyleri ise kontrol grubundan anlamlı olarak düşüktü.

12. Liraglutid uygulanan gruplarda serum MDA, SOD değerleri ise kontrole yakın izlenirken, serum testosteron değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi.

Sonuç olarak sıçanlarda deneysel diyabet ve torsiyon/detorsiyon modelinde testis zerine GLP-1 agonisti olan liraglutidin antidiyabetik, antioksidatif ve antiapopitotik etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, bu ajanın diyabet ve torsiyon/detorsiyon gruplarında meydana gelen yapısal değişiklikler ile hormon seviyeleri üzerine olumlu etkilerinin, uzun süreli kullanımda daha etkin olabileceği dşnld. Liraglutidin, testise etkileri ile ilgili ileri araştırmaların yapılması ve buna yönelik bilgilerin artmasıyla, gelecekte diyabet hastalarında ve/veya torsiyon/detorsiyon vakalarında, testis yapısı ve fonksiyonunun korunmasında, alternatif bir tedavi ajanı olabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. **Zhao LC, Lautz TB, Meeks JJ, Maizels M.** Pediatric testicular torsion epidemiology using a national database: incidence, risk of orchiectomy and possible measures toward improving the quality of care. *J Urol.* **2011;186(5):2009-2013.**
2. **Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM.** Testicular torsion: Diagnosis, evaluation and management. *Am Fam Physician.* **2013;88(12):835-840**
3. **Filho D. W, Torres M. A, Bordin A. L. B, Crezcynski-Pasa T. B, and Boveris A.** Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 25, no. 1-2, pp. 199–210, **2004.**
4. **Moon C, M. Kim Ahn, S, Yasuzumi F, and Shin T.** Increased expression of both constitutive and inducible forms of nitricoxide synthase in the delayed phase of acute experimental testicular torsion. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 67, no. 4, pp. 453–456, **2005.**
5. **Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D.** Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews*, vol. 53, no. 1, pp. 135–159, **2001**
6. **Ozkurkcugil C, Yardimoglu M, Dalcik H, Erdogan S, Gokalp A.** Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. *British Journal of Urology International*, vol. 93, no. 7, pp. 1094–1097, **2004.**
7. **Kanter M.** Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 89, no. 3, pp.314–320, **2010.**
8. **Lysiak JJ, Nguyen QAT, Kirby JL, Turner T T.** Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of cjun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biology of Reproduction*, vol. 69, no. 1, pp. 202–210, **2003.**
9. **Amaral S, Mota PC, Lacerda B, Alves M, Pereira Mde L, Oliveira PJ, et al.** Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. *Mitochondrion* **2009;9:41–50.**
10. **Lysiak J.J., Zheng S., Woodson R. and Turner T.T.** Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2. *Cell Tissue. Res.* 328, 411- 419. **2007.**
11. **Florencia A, Alex B, Nam Ho C, Gisela D, Sheree D, Trisha D, Michael H, Christopher, Magliano H, Patterson D, Scott C, Shaw C, ,Soltesz J, Juliet U.S, David W.** International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas.* 6th edition, **2013.**
12. **The United Kingdom Prospective Diabetes Study Group:** U.K. prospective diabetes study. 16: Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes.* **1995;44:1249–1258.**
13. **The Diabetes Control and Complications Trial Research Group:** The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* **1993;329:977–986.**

14. **American Diabetes Association.** Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care.* **2014**;37 Suppl 1:S14-80.
15. **Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N.** Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* **2007**;22:1871–7.
16. **Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE.** The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* **2008**;29:251–9.
17. **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 (2012)** 719–725
18. **Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, et al.** Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem* **2000**; 43: 1664–1669.
19. **Agerso H, Jensen LB, Elbrond B, et al.** The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men. *Diabetologia* **2002**; 45: 195–202.
20. **Helleberg K, Malm-Erjefält M, Bjørnsdottir I, et al.** Metabolism and excretion of [Pal-3H]-liraglutide in human healthy subjects. *Diabetes* **2008**; 57(Suppl.1)
21. **Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, et al.** Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet.* **2009**; 374(9683):39–47.
22. **Zinman B, Gerich J, Buse JB, Lewin A, Schwartz S, Raskin P, et al.** Efficacy and safety of the humanglucagon-like peptide-1 analog liraglutide in combination with metformin and thiazolidinedione in patients with type 2 diabetes (LEAD-4 Met +TZD). *Diabetes Care.* **2009**;32(7):1224–30.
23. **Chitnis AS, Ganz ML, Benjamin N, Langer J, Hammer M.** Clinical Effectiveness of Liraglutide Across Body Mass Index in Patients with Type 2 Diabetes in the United States: A Retrospective Cohort Study. *Adv Ther* **(2014)** 31:986–999
24. **Garber, A., Henry, R., Ratner, R., Garcia-Hernandez, P.A., Rodriguez-Pattzi, H., Olvera-Alvarez, I., Hale, P.M., Zdravkovic, M., Bode B;** LEAD-3 (Mono) Study Group. **2009.** Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *Lancet.* 373, 473-481. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 694-702 **2015.**
25. **Vilsboll T.** Liraglutide: a once-daily GLP-1 analogue for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs* **2007**; 16: 231–237.
26. **Juhl CB, Hollingdal M, Sturis J, et al.** Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Diabetes* **2002**; 51: 424–429.
27. **Vilsboll T, Brock B, Perrild H, et al.** Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, improves pancreatic B-cell function and arginine-stimulated insulin secretion during hyperglycaemia in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* **2008**; 25: 152–156.
28. **Courreges JP, Vilsboll T, Zdravkovic M, et al.** Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* **2008**; 25:1129–1131.

29. **Jacobsen LV, Hindsberger C, Robson R, et al.** Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of the GLP-1 analogue liraglutide. *Br J Clin Pharmacol* **2009**; 68: 898–905.
30. **Iwao T, Sakai K, Sata M.** Postprandial serum C-peptide is a useful parameter in the prediction of successful switching to liraglutide monotherapy from complex insulin therapy in Japanese patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* **2013**; 27: 87–91.
31. **Araki H*, Tanaka Y, Yoshida S, Morita Y, et al.** Oral glucose-stimulated serum C-peptide predicts successful switching from insulin therapy to liraglutide monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes and renal impairment. *J Diabetes Invest* **2014**; 5: 435–441
32. **Zavattaro M, Caputo M, Sama MT, Mele C, et al.** One-year treatment with liraglutide improved renal function in patients with type 2 diabetes: a pilot prospective study. *Endocrine*. **2015**
33. **Inoue T, Inoguchi T, Sonoda N, Hendarto H, Makimura H, Sasaki S, Yokomizo H, Fujimura Y, Miura D, Takayanagi R.** GLP-1 analog liraglutide protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Atherosclerosis* 240 (2015) 250e259
34. **Jelsing J, Vrang N, Hansen G, Raun K, Tang-Christensen M, Knudsen LB.** Liraglutide: short-lived effect on gastric emptying—long lasting effects on body weight. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14: 531–538, **2012**.
35. **Candeias EM., Sebastião IC, Cardoso SM, Correia SC, Carvalho CI, Plácido AI, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI, Duarte AI.** Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World J Diabetes* **2015** June 25; 6(6): 807-827
36. **Briyal S, Shah S, Gulati A.** Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide in the rat brain following focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 281 (2014) 269–281
37. **Kimura T*, Kaneto H, Shimoda M, Hirukawa H, Okauchi S, Kohara K, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kaku K.** Protective effects of pioglitazone and/or liraglutide on pancreatic β -cells in db/db mice: Comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 400 (2015) 78–89
38. **Rasmussen CB*, Lindenberg S.** The effect of liraglutide on weight loss in women with polycystic ovary syndrome: an observational study. *Frontiers in Endocrinology*. **2014**
39. **Gao H, Zeng Z, Zhang H, Zhou X, Guan L, Deng W, Xu L.** The Glucagon Like Peptide-1 Analogue Liraglutide Inhibits Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Liver of Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 694-702. **2015**.
40. **Cantini G, Di Franco A, Samavat J, Forti G, Mannucci E, Luconi M.** Effect of liraglutide on proliferation and differentiation of human adipose stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 402 (2015) 43–50
41. **Leslie P. Gartner Jlh.** Concise Histology. 4th Ed: *Elsevier*, **2011**.
42. **Eroschenko VP.** Difiore's Atlas of Histology. 12th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; **2013**.

43. **Michael H. Ross WP.** Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology. 6th Ed. 351 West Camden Street. Baltimore, MD 21201: Lippincott Williams & Wilkins; **2011**.
44. **Mescher AL.** Junqueira's Basic Histology: Text And Atlas. 13 Ed. United States: Mcgraw-Hill Education; **2013**.
45. http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/CH27_Male_Duct_System_I.htm.
46. **S.F.G.** Developmental Biology. 9th Ed. **2013**
47. **O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, and Simpson ER.** Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **2001**; 22(3): 289-318.
48. **Pollard T.D.EWC.** Cell Biology. 1 st Ed. Philadelphia: Elsevier; **2004**
49. **Vitale R, Fawcett DW, Dym M.** The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec.* **1973** Jul;176(3):331-44.
50. **Drucker, D.J.** Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 26, 2929-2940. **2003**
51. **Elbrond B, Jakobsen G, Larsen S, et al.** Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects. *Diabetes Care.* **2002**;25(8):1398–1404.
52. **Montanya E, Sesti G.** A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther.* **2009**;31(11): 2472–2488.
53. **McClellan PL, Holscher C.** Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* **2014**;76 Pt A: 57–67.
54. **Raun K, von Voss P, Gotfredsen CF, Golozoubova V, Rolin B, Knudsen LB.** Liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 analog, reduces body weight and food intake in obese candy-fed rats, whereas a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, vildagliptin, does not. *Diabetes.* **2007**;56(1):8–15.
55. **Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, et al.** Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation.* **2004**;109(8):962–965.
56. **Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, et al.** A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia.* **2010**;53(10):2256–2263.
57. **Watson E, Jonker DM, Jacobsen LV, Ingwersen SH.** Population pharmacokinetics of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide-1 analog, in healthy volunteers and subjects with type 2 diabetes, and comparison to twice-daily exenatide. *J Clin Pharmacol.* **2010**;50(8): 886–894.
58. *Pharmaceuticals* **2010**, 3(3), 764-781; doi:[10.3390/ph3030764](https://doi.org/10.3390/ph3030764)
59. **Kasahara E, Sato E.F, Miyoshi M.** Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate, *Biochem. J* **2002**; 365:849-856.

60. **Pentyala S, Lee J, Yalamanchili P, Vitkun S, Khan S. A.** "Testicular torsion: a review," *Journal of Lower Genital Tract Disease*, vol. 5, no. 1, pp. 38–47, **2001**.
61. Cuckow P. M, Frank J. D, "Torsion of the testis," *British Journal of Urology International*, vol. 86, no. 3, pp. 349–353, **2000**.
62. **Melekos M. D, Asbach H. W, Markou S. A.** "Etiology of acute scrotum in 100 boys with regard to age distribution," *Journal of Urology*, vol. 139, no. 5, pp. 1023–1025, **1988**.
63. **Kono T, Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Shinbori C, Satoh K.** Real-time monitoring of nitric oxide and blood flow during ischemia-reperfusion in the rat testis. *Mol Cell Biochem.* **2006**; 286 (1-2):139-45. ,
64. **Lysiak JJ, Nguyeh QA, Turner TT.** Peptide and non peptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of testis after torsion. *J Androl.* **2002**
65. **Rabinowitz R, Hulbert WC.** Acute scrotal swelling. *Urol Clin North Am.* **1995**; 22: 101-5.
66. **Reyes JG., Farias JG., Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, B. Zepeda A, D.Moreno R.** The Hypoxic Testicle: Physiology and Pathophysiology. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2012, Article ID 929285, 15 pages doi:10.1155/2012/929285*
67. **Anderson JB, Williams RC.** Fertility after torsion of spermatic cord. *Br J Urol.* **1990**; 65: 225-30.
68. **Visser AJ, Heyns CF.** Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU International.* **2003**.
69. **Anderson MJ, Dunn JK, Lipshultz LI, Coburn M.** Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. *Journal of Urology.* **1992**.
70. **Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA.** Ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research.* **2002**. 105: 248-258.
71. **Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology.* **2000**. 190: 255-266.
72. **Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W.** Intestinal ischemia:reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* **1994**.
73. **Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X.** Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock.* **2002**, 17: 114-119.
74. **Taşkıran A.** Koroner By-Pass Yapılan Olgularda Lipid Hidroperoksit, Antioksidan Kapasite ve Oksidan Strese Duyarlılık. Edirne: *TÜ Tıp Fak,* **2002**.
75. **Noyan A.** Fizyoloji Ders Kitabı. Ankara: 6. Baskı Meteksa A **1989**; 1048–1066.
76. **Jain G.C, Jangir R. N,** "Modulation of diabetes-mellitusinduced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants," *Pharmacognosy Reviews*, vol. 8, no. 16, pp. 113–121, **2014**.
77. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. "Global prevalence of diabetes—estimates for the year 2000 and projections for 2030," *Diabetes Care*, vol. 27,no. 5, pp. 1047–1053, **2004**.

78. **Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J.** DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* **2004**; 554: 297-304.
79. **Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP.** Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* **2007**;22(1):188-96.
80. **Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA.** Impact of body mass index values on sperm quantity and quality *J Androl* **2006**;27(3):450-2.
81. **Sönmez M.F., Karabulut D., Kilic E., Akalin H., Sakalar Ç., Gunduz Y., Kara A., Dundar M.** The effects of streptozotocin-induced diabetes on ghrelin expression in rat testis: biochemical and immunohistochemical study. *Folia histochemica et cytobiologica* vol. 53, no. 1, **2015** pp. 26–34.
82. **Milloning G.** Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. *J App Phy.* **1961**; 32-1637.
83. **B. Shrilath.** Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology*, vol. 23,no. 4, pp. 578–587, **2007**.
84. **Kilarkaje N, Al-Hussaini H, Al-Bader M.M.** Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *European Journal of Pharmacology* **737(2014)** 29–40.
85. **Duman A, Mogulkoc R, Baltaci AK, Menevse E.** 3', 4'-dihydroxyflavonol attenuates tissue damage in unilateral testis ischemia-reperfusion in rats. *Bratisl Lek Listy.* **2015**;116(12):735-40
86. **Gawish AM, Issa AM, Aziza M A, Ramadan S.** Morphometrical, Histopathological, and Cytogenetical ameliorating Effects of Green tea Extract on Nicotine Toxicity of the Testis of Rats. *Journal of American Sci.* **2010**;6(11):401-411.
87. **Erpek S, Balkaya M, Ünsal H, Ünsal C.** Effects of Alcohol and Passive Cigarette Smoking on the Swiss Albino Mice Testes. *İnönü Üni Tıp Fak Derg.* **2004** 11(1) 1-6.
88. **Fouad A.A., Jresat I.** Thymoquinone therapy abrogates toxic effect of cadmium on rat testes. *Andrologia.* **2014**.
89. **Sharma P, Singh R.** Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* **2010** Apr;84(4):378-84.
90. **Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, Guffanti A, McElreavey K.** Mutations in the FOG2/ZFP2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Human Molecular Genetics*, **2014**, Vol.23, No. 14
91. **Radyasyon. Taş M, CİRİT Ü, Özkan O, Denli M, Zincircioğlu S.M., Şeker U, Özmen M.F., Eren L.B.** Protective Role of Vitamin C on Sperm Characteristics and Testicular Damage in Rats Exposed to Radiation. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **20** (1): 59-64, **2014**.
92. **Lysiak J.J., Turner S.D., Turner T.T.,** Molecular Pathway of Germ Cell Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion of the Rat Testis. *Biology of reproduction* **63**, 1465–1472. **2000**.

93. **Shackleton C, Ettinger SI, Scudamore CH, To-lekis PF, Keown PA:** Effect of a 21-aminosteroid, U74006F, on lipid peroxidation and glomerulo-tubular function following experimental renal ischemia. *J Surg Res*; 57: 433-437, **1994**.
94. **Al-maghrebi M., Renno W.M.** Genistein alleviates testicular ischemia and reperfusion injury-induced spermatogenic damage and oxidative stress by suppressing abnormal testicular matrix metalloproteinase system *via* the notch 2/jagged 1/hes-1 and caspase-8 pathways. *Journal of physiology and pharmacology* **2016**, 67, 1, 129-137.
95. **Kakimoto, T. Inoguchi, T. Sonta, et al.,** Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats, *Diabetes* 51 (**2002**) 1588e1595.
96. **Jiang D, Wang Y, Zang Y, Liu X, Zhao L, Wang Q, Liu C, Feng W, Yin X, Fang Y.** Neuroprotective Effects of rhGLP-1 in Diabetic Rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Drug Development Research* 77: 124–133
97. **Temel N, Cigremis Y, Gecer M, Akgoz M.** The Gene Expression of Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes in Rat Liver Tissue. *Medicine Science* **2015**;4(4):2834-48
98. **Kilarkaje N, Al-Bader, M.M.** Diabetes-Induced Oxidative DNA Damage Alters p53-p21CIP1/Waf1 Signaling in the Rat Testis. *Reproductive Sciences*. Vol. 22(1) 102-112. **2015**
99. **Koroglu P, Senturk G.E, Yucel D, Ozakpinar O.B, Uras F, Arbak S.** The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. *Peptides* 63(**2015**) 47-54.
100. **Fontoura P, cardoso M.C.A, Erthal-Martins M.C, Werneck C, Sartorio C, Ramos C.F.** The effects of liraglutide on male fertility: a case report. *Reproductive BioMedicine online* (**2014**) 29, 644-646
101. **Romeo C. Antonuccio P., Esposito M., Marini H., Impellizzeri P., Turiaco N., Altavilla D., Bitto A., Zuccarello B., Squadrito F.** Raxofelast, a hydrophilic vitamin e-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury. *Urol Res* (**2004**) 32: 367–371 DOI 10.1007/s00240-004-0436-4.
102. **Mete F., Tarhan H., Celik O., Akarken I, Vural K., Ekin R.G., Aydemir I., Ilbey Y.O.** Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Journal of Andrology* (**2016**) 18, 1–4.
103. **Zhang Y., Lv Y., Liu Y.J., Yang C., Hu H.J., Meng X.E., Li M.X., Pan S.Y.** Hyperbaric Oxygen Therapy in Rats Attenuates Ischemia-reperfusion Testicular Injury Through Blockade of Oxidative Stress, Suppression of Inflammation, and Reduction of Nitric Oxide Formation. *UROLOGY* 82 (2), **2013**
104. **Mertoglu C., Senel U., Cayli S., Tas U., Kiraz Z.K., Özyurt H.** Protective role of methylprednisolone and heparin in ischaemic-reperfusion injury of the rat testicle. *Andrologia* **2015**.
105. **Sanderson H, Reynolda C.A, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M.** Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation. *Molecular Neurobiology*. **2013**.
106. **Jaeschke H, Woolbright B.L.** Current strategies to minimize hepatic ischemia–reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplantation Reviews* 26 (**2012**) 103–114

107. **Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB.** The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection. *J Mol Cell Cardiol.* **1993**;25(7):759-800.
108. **Sobey CG, Woodman OL.** Myocardial ischaemia: what happens to the coronary arteries?. *Trends Pharmacol Sci.* **1993**;14(12):448-53.
109. **Reffelmann T, Kloner RA.** The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* **2006**;101(5): 359-72.
110. **Aruna Devi R, Lata S, Bhadoria BK, Ramteke VD, Kumar S, Sankar P, Kumar D, Tandan SK.** Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2''-O-galloyl)-beta-D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. *Eur J Pharmacol.* **2010** ;626(2-3):205-12.
111. **Cayli S., Ocakli S., Senel U., Karaca Z., Erdemir F., Delibasi T.** Role of an endothelin type A receptor antagonist in regulating torsion-induced testicular apoptosis in rats. *Histol Histopathol (2016) 31: 585-594*
112. **Mahmoud A.M.** Protective Effects of Umbelliferone in Experimental Testicular Ischaemia/ Reperfusion Injury in Rats. Mahmoud, *Anat Physiol* **2016**, 6:1
113. **Taati M., Moghadasi M., Dezfoulia O., Asadian P.** Effects of Ghrelin on Testicular Ischemia/Reperfusion-Induced Injury. *Acta Med Iran* **2016**;54(1):32-38.
114. **Kim H.J., Lee J.W., Hwang B.R., Lee Y.A., Kim J.I., Cho Y.J., Jhun H.J., Han J.S.** Protective effect of pterostilbene on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery.* **2016**
115. **Minutoli L., Puzzolo D., Rinaldi M, Irrera N., Marini H., Arcoraci V., Bitto A., Crea G., Pisani A., Squadrito F., Trichilo V., Bruschetta D., Micali A., Altavilla D.** ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016, Article ID 2183026, 10 pages.*
116. **Abdel-Rahman M.M, Mahmoud A.M, N. Mostafa N.M, Saleh M.E, Eissa. H.M.** Sildenafil reduces ischemia/reperfusion testicular injury after torsion/detorsion in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (02), pp. 135-140, February, 2016*
117. **Dokmeci D, Kanter M, Inan M, Aydoğdu N, Basaran U.N, Yalcin O, Turan F.M.** Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol . (2007) 81: 655-663*
118. **Kanter M.** Protective effects of Ginkgo Biloba (EGF 761) on testicular torsion/ detorsion-induced ischemia-reperfusion injury rats. *Experimental and Molecular Pathology.* **2011**
119. **Roy V.K, Chenkual L, Gurusubramanian G.** Protection of testis through antioxidant action of *Mallotus roxburghianus* in alloxan-induced diabetic rat model. *Journal of Ethnopharmacology.* **2015**
120. **Cai L, Chen S, Evans T, Deng D.X, Mukherjee K, Chakrabarti S.** Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res.* **2000.**
121. **Koh P.** Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testis. *J Vet Med Sci* **2007**; 69: 969-971.

122. **Başay S., Adsan Ö., İnal G., Çetinkaya M.** Verapamil ve Alfa-Tokoferolün Rat böbreğindeki deneysel reperfüzyon hasarı üzerine karşılaştırmalı etkileri. *Üroloji Dergisi: 29 (1): 11-15, 2003*
123. **Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagrıyanık A, Cavdar Z.**The Effects of α -Lipoic Acid against Testicular Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *The Scientific World Journal* Volume **2012**, Article ID 489248, 8 pages
124. **Bner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I.** Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia- reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int* **2006**;22(1):99-105
125. **Li. P-C, Liu. L-P, Jou. M-J, Wang H-K.** The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice. *Li et al. BMC Neurosci (2016) 17:37 DOI 10.1186/s12868-016-0272-9*
126. **Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, Sasaki S, Inoue T, Fujimura Y, Miura D, Takayanagi R.** Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* **232 (2014) 156e164**
127. **Noyan-Ashraf M.H, Momen M.A. Ban K, Sadi A, Zhou Y-Q, Riazi A.M. Baggio L.L, Henkelman R.M, Husain M, D.J. Drucker.** GLP-1R Agonist Liraglutide Activates Cytoprotective Pathways and Improves Outcomes After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Diabetes* **58:975–983, 2009**
128. **Hunter K, Holscher C.** Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci* **13:33. 2012**

ÖZGEÇMİŞ

Sinem Hazır 1990 yılında Edirne’de doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Adana’da tamamladı. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Sinem Hazır hala aynı anabilim dalında eğitim-öğretimini sürdürmektedir.

