

**T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AGOMELATİN VE GALLİK ASİD'İN STREPTOZOTOZİN (STZ) İLE
İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK SIÇAN TESTİSLERİNDEKİ OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE ANTİOKSİDAN ETKİSİ**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Arş. Gör. Gürkan Yiğittürk

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Altuğ Yavaşoğlu**

**İZMİR
2014**

**T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AGOMELATİN VE GALLİK ASİD'İN STREPTOZOTOZİN (STZ) İLE
İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK SIÇAN TESTİSLERİNDEKİ OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE ANTİOKSİDAN ETKİSİ**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Arş. Gör. Gürkan Yiğittürk

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Altuğ Yavaşoğlu**

**İZMİR
2014**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(ADI SOYADI)

(İMZA)

Başkan: Doç. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

Üye: Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Eylül, 2014

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmalarındaki ve eğitimimdeki katkılarından dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU ve eşi Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU' na ayrıca tezimde büyük katkıları bulunan Yrd. Doç. Dr. Oytun ERBAŞ ve Uzm. Dr. Fatih OLTULU'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren bana tecrübe ve deneyimlerini açarak destek olan hocalarım; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşegül UYSAL ve Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ, Doç. Dr. Yiğit UYANIKGİL, Uzm. Dr. Türker ÇAVUŞOĞLU, Prof. Dr. Meral BAKA, Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM, Doç. Dr. Utku ATEŞ, Yard. Doç. Dr. Özlem YILMAZ DİLSİZ'e teşekkür ederim

Muğla Sıtkı Koçman Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Feral ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam boyunca beni destekleyen arkadaşlarım Hülya UĞUR, Eda AÇIKGÖZ, Pelin TOROS, Ümmü GÜVEN, Fahriye DÜZAĞAÇ'a ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim çalışanları Ertuğrul Büyüktopçu, Şahin PALA, Erdinç Yılmaz, Sevim Balkız, Selman Bağcı, Necla MENEKŞE, Ayşe FİDAN'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Arş. Gör. Gürkan YİĞİTTÜRK

ÖZET

AGOMELATİN VE GALLİK ASİD'İN STREPTOZOTOZİN (STZ) İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK SIÇAN TESTİSLERİNDEKİ OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ANTIOKSİDAN ETKİSİ

Diabetes mellitus (DM) dünya genelinde mortalite ve morbidite açısından insidansı yüksek bir hastalıktır. Diyabet komplikasyonlarının gelişmesi ve ilerlemesinde oksidatif stresin yer aldığına dair birçok literatür bulunmaktadır. Protein glikasyonu ve glukoz oto oksidasyonu reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Oksidatif stres antioksidan savunma sistemlerini zayıflatmakta, plazma proteinlerini glikozillendirerek ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) dönüştürmektedir.

Diyabet multisistemik bir hastalıktır ve etkileri üreme sistemi üzerinde de gözlenmektedir. Diyabet kaynaklı aşırı üretilen ROS ve glikozile son ürünler, testis dokusundaki hasarın ana sebeplerindendir.

Agomelatin ve Gallik asid'in oksidatif stresi baskılayarak diyabetin yol açtığı artan testis hasarına tedavi edici olası etkisinin araştırılması çalışmamızın ana amaçlarındandır.

Yüksek düzeyde ROS üretimi hücrelerde apoptoza sebep olabilmektedir. Ayrıca, inflamasyon kaynaklı vasküler yapıdaki bozulmalar ve tübül dejenerasyonları diyabetin üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerindendir. Çalışmamızda; bu sorunların tespitine yönelik apoptoz oranlarının belirlenmesinde immünohistokimyasal TUNEL metodu, diyabetin oluşturduğu vasküler yapı ve

kapillerizasyon bozukluklarının ve olası onarım modellerinin incelenmesinde VEGF belirteci, inflamasyon/fibrozis ve olası onarım modellerinin incelenmesinde ise TNF α , NOS2 ve Fibronektin immünohistokimya belirteçleri kullanılmıştır. İmmünohistokimya analizi için biyopsi/parça takibi ve ışık mikroskopik analiz yapılmıştır.

Agomelatin ve Gallik asid tedavilerinin Malondialdehit (MDA) seviyelerini önemli derecelerde düşürdüğü görülmüştür. Testis dokusundaki Superoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (KAT) aktiviteleri ise artmış olarak bulunmuştur. Tedavi grubu testislerde diyabet grubuna göre immünohistokimya ile belirlenmiş Fibronektin, NOS2, TNF α , ve VEGF ifadesinin azaldığı görülmüştür.

Agomelatin tedavisinin, diyabete bağlı gelişen hasarda anlamlı biyokimyasal ve histolojik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Gallik asid'in ise kullandığımız doza bağlı olarak biyokimyasal parametrelerde düzeltici etkiler gösterse de testis hasarı üzerine histolojik düzeyde minimal tedavi edici etkisinin olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak; Agomelatin uygulamasının, diyabetik sıçan testislerinde oksidatif stres seviyesini düşürerek, testiküler hasarı azaltan bir ajan olduğu gözlenmiştir. Gallik asid ise zayıf tedavi edici etki göstermektedir.

Bu araştırma, agomelatin ve gallik asidin diyabetik testis üzerine etkisini histolojik ve biyokimyasal olarak inceleyen ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Streptozotozin (STZ), Agomelatin, Gallik Asid, Diyabet, Testis, Antioksidan.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT ROLE OF AGOMELATINE AND GALLIC ACID ON OXIDATIVE STRESS IN STZ-INDUCED DIABETIC RAT TESTES

Diabetes mellitus (DM) is a disease with a high incidence in terms of morbidity and mortality of worldwide. A considerable amount of literature suggests major role of oxidative stress in development and progression of diabetic complications. Protein glycation and glucose autoxidation can produce reactive oxygen species (ROS) that can catalyze lipid peroxidation. Alternative potential mechanisms of oxidative stress include the decrease of antioxidant defense. Separately, reaction of glucose with plasma proteins forms advanced glycation end products (AGE), triggering production of ROS.

Diabetes is a multisystem disorder and its effects are observed on the reproductive system. One of the main causes of testicular tissue damage are diabetes-induced overproduction of ROS and glycated end products.

One of our main objectives; investigate the possible effects of Agomelatine and Gallic acid by suppressing oxidative stress in diabetes- induced testicular damage.

High levels of ROS production may lead to induction of apoptosis. In addition, Inflammation induced degeneration of vascular structures and seminiferous tubules possesses harm effects on the reproductive system in diabetes. In this study, Terminal-deoxynucleoitidyl transferase mediated nick end-labeling (TUNEL) assay was used for detection of Apoptosis. For investigation of vascular structures and capillary disorders induced by diabetes and possible repair models, VEGF

immunohistochemistry marker was studied. TNF α , NOS2 and Fibronectin immunohistochemistry markers were used for investigation of inflammation/fibrosis induced by diabetes and possible repair models. For analysis of immunohistochemistry, we were performed tissue processing and light microscopic investigation.

Agomelatine and Gallic acid treatment decreased significantly elevated tissue malondialdehyde (MDA) levels and increased reduced SOD and CAT enzyme activities in testes tissue samples. NOS2, TNF α and VEGF expression levels decreased at treatment rat groups testes than diabetic rat group.

Agomelatine treatment showed an improvement on biochemical parameters and histopathologic appearance on rat testes. Although Gallic acid showed regenerative effects on biochemical parameters according to dose we used, it was found histologically to be cure minimal on testes damages.

As a result; it is observed that Agomelatine administration is a potentially beneficial agent to reduce testicular damage by decreasing oxidative stress level and testicular damages in diabetic rat testes. But, Gallic acid treatment shows poor therapeutic effect.

This research is the first study to investigate the possible effects of agomelatine and gallic acid about biochemical and histological methods in diabetes-induced testicular damage.

Keywords: Streptozotocin (STZ), Agomelatine, Gallic Acid, Diabetes, Testes, Antioxidant.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	V
TABLOLAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ	2
1.1 Diabetes Mellitus.....	3
1.1.1 Tanım	3
1.1.2 Klinik Bulgular ve Tanı	3
1.1.3 Sınıflandırma.....	5
1.1.4 Epidemiyoloji.....	9
1.1.5 Komplikasyonlar	10
1.2 Deneysel Diyabet Modelleri	13
1.3 Diyabet ve Oksidatif Stres.....	15
1.3.1 Serbest Radikaller	15
1.4 Diyabet ve Testis	19
1.5 Testis Anatomisi.....	20
1.6 Testis Embriyolojisi	20
1.6.1 Primordiyal Germ Hücreleri	21
1.6.2 Cinsiyetin Belirlenmesi.....	22
1.6.3 Testisin Gelişimi	22
1.7 Testis Histolojisi	23
1.7.1 Sertoli Hücreleri:.....	24
1.7.2 Spermatogonyumlar	26
1.7.3 Spermatozoidler	27

1.7.4 Spermatidler	28
1.7.5 Sperm	29
1.7.6 Diğer Erkek İç Üreme Organları.....	31
1.8 Testis Fizyolojisi.....	33
1.8.1 Spermatogenez ve Hormonal Faktörler	33
1.8.2 Erkek Cinsiyet Hormonları	34
1.8.3 Testislerin Hormonal Düzenlenmesi.....	34
1.9 Antioksidan Moleküller	35
1.9.1 Agomelatin.....	35
1.9.2 Gallik Asit.....	37
1.10 Oksidatif Stres Biyomarkerları.....	39
1.10.1 Nitrik Oksid ve Nitrik Oksid Sentaz	39
1.10.2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	40
1.10.3 Fibronektin	41
1.10.4 Tümör Nekroz Faktör (TNF α)	42
1.11 Apoptozis	44
1.11.1 Apoptozis ve Proteolitik Kaskadlar.....	45
1.11.2 Apoptozun Mekanizması	47
1.12 AMAÇ.....	48
2. MATERYAL VE METOT	49
2.1 Deneysel Yöntem.....	49
2.2 Deney Grupları	49
2.3 STZ Uygulaması ve Testislerin Alınması	50
2.4 Mikroskopik Analiz.....	53
2.4.1 Tespit Solüsyonları	53
2.4.2 Işık Mikroskopik Yöntem	53
2.4.3 Johnsen Testiküler Skoru.....	59
2.4.4 Testis Seminifer Tübül Çaplarının Ölçümü.....	60

2.4.5 Bazal Lamina Kalınlık Ölçümü	60
2.5 Biyokimyasal Analizler	60
2.5.1 SOD Aktivitesinin Belirlenmesi	60
2.5.2 Testis Lipid Peroksidasyon Ölçümü (MDA)	61
2.5.3 Katalaz Aktivite Ölçümü (KAT).....	61
3. BULGULAR.....	62
3.1 Biyokimyasal Bulgular	63
3.1.1 SOD Aktivitesinin Belirlenmesi	63
3.1.2 Testis Lipid Peroksidasyon Ölçümü (MDA)	64
3.1.3 Katalaz Aktivite Ölçümü (KAT).....	65
3.2 Histolojik Bulgular	66
3.2.1 Hematoksilen – Eosin Boyama	66
3.2.2 PAS (Periyodik Asit Schiff) Boyama	78
3.3 İmmünohistokimyasal Bulgular	81
3.3.1 Fibronektin İmmunoreaktivitesi.....	81
3.3.2 NOS2 İmmunoreaktivitesi	86
3.3.3 TNF α İmmunoreaktivitesi.....	91
3.3.4 VEGF İmmunoreaktivitesi	96
3.4 Tünel Bulguları	101
3.5 Morfometrik Bulgular	107
3.5.1 Johnsen Testiküler Skoru	107
3.5.2 Tübül Çapı Ölçümü.....	108
3.5.3 Bazal Lamina Kalınlık Ölçümü	109

4. TARTIŞMA	111
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	143



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1-1: Diyabetes mellitus'un klinik bulguları	3
Tablo 1-2: Diyabet tanı algoritması	5
Tablo 1-3: Spesifik diyabet tipleri.....	8
Tablo 1-4: Antioksidan savunma sistemleri.....	16
Tablo 1-5: Nitrik oksid ve oksidatif stres.....	40
Tablo 2-1: Johnsen testiküler biyopsi skoru.....	59
Tablo 2-2: SOD aktivite ölçümü için kullanılan çözeltiler.	61
Tablo 3-1: Kontrol grubu sıçanların STZ enjeksiyonu öncesi ve sonrası; vücut-testis ağırlıkları ve kan şekeri düzeylerinin ortalamaları.....	62
Tablo 3-2: SOD Aktivite ölçüm ve istatistiksel değer tablosu.....	63
Tablo 3-3: MDA ölçüm ve istatistiksel değer tablosu.	64
Tablo 3-4: Katalaz aktivite ölçüm ve istatistiksel değer tablosu.....	65
Tablo 3-5: Deney gruplarının SOD, KAT aktiviteleri MDA miktarlarına göre p değerleri dağılım	66
Tablo 3-6: Testislere ait Fibronektin immunoreaktivitesi.....	85
Tablo 3-7: Testislere ait NOS2 immunoreaktivitesi	91
Tablo 3-8: Testislere ait TNF α immunoreaktivitesi	96
Tablo 3-9: Testislere ait VEGF immunoreaktivitesi	101
Tablo 3-10: TUNEL Boyama Skor Tablosu ve p değerleri.....	106
Tablo 3-11: Johnsen Testiküler Skor Dağılımları ve p değerleri.....	107
Tablo 3-12: Tübül çaplarının karşılaştırılması ve p değerleri.....	108
Tablo 3-13: Bazal lamina kalınlık karşılaştırılması ve p değerleri	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1-1: 3 haftalık embriyoda primordiyal germ hücreleri	21
Şekil 1-2: Testisin genel organizasyonu.	25
Şekil 1-3: İnterstisyel hücreler ve seminifer epitel hücreleri.	26
Şekil 1-4: Seminifer tübül ve spermatogenik seri hücreleri.....	27
Şekil 1-5: Spermatozoon yapısı TEM görüntüsü	30
Şekil 1-6: Leydig hücre yapısı TEM görüntüsü.....	31
Şekil 1-7: Melatonin ve agomelatinin kimyasal yapısı.	37
Şekil 1-8: Gallik asidin kimyasal yapısı.	38
Şekil 1-9: TNF α ilişkili sinyal yolları.	44
Şekil 2-1: Hayvanların gruplandırılması.....	50
Şekil 2-2: STZ i.p. uygulaması.	51
Şekil 2-3: Gavaj uygulaması.	51
Şekil 2-4: Sıçanlarda anestezi uygulama ve ağırlık tartma.	52
Şekil 2-5: Testislerin alınması.....	52
Şekil 3-1: SOD aktivite ölçüm grafiği	63
Şekil 3-2: MDA ölçüm grafiği.	64
Şekil 3-3: Katalaz aktivite ölçüm grafiği.	65
Şekil 3-4: Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde Hematoksilen Eosin boyama.....	68
Şekil 3-5: DM grubuna ait histolojik kesitlerde Hematoksilen Eosin boyama.....	71
Şekil 3-6: AGO grubuna ait histolojik kesitlerde Hematoksilen Eosin boyama.....	74
Şekil 3-7: GAL grubuna ait histolojik kesitlerde Hematoksilen Eosin boyama	77
Şekil 3-8: Kontrol grubuna ait histolojik kesit PAS boyama.....	79
Şekil 3-9: DM grubuna ait histolojik kesit PAS boyama.....	79
Şekil 3-10: AGO grubuna ait histolojik kesit PAS boyama.....	80
Şekil 3-11: GAL grubuna ait histolojik kesit PAS boyama	80
Şekil 3-12: Kontrol grubu fibronektin immunoreaktivitesi	81
Şekil 3-13: DM grubu fibronektin immunoreaktivitesi	82
Şekil 3-14: AGO grubu fibronektin immunoreaktivitesi	83
Şekil 3-15: GAL grubu fibronektin immunoreaktivitesi.....	84
Şekil 3-16: Fibrozis skor grafiği.	85
Şekil 3-17: Kontrol grubu NOS2 immunoreaktivitesi	87
Şekil 3-18: DM grubu NOS2 immunoreaktivitesi	88

Şekil 3-19: AGO grubu NOS2 immunoreaktivitesi.....	89
Şekil 3-20: GAL grubu NOS2 immunoreaktivitesi	90
Şekil 3-21: Kontrol grubu TNF α immunoreaktivitesi.....	92
Şekil 3-22: DM grubu TNF α immunoreaktivitesi.....	93
Şekil 3-23: AGO grubu TNF α immunoreaktivitesi	94
Şekil 3-24: GAL grubu TNF α immunoreaktivitesi.....	95
Şekil 3-25: Kontrol grubu VEGF immunoreaktivitesi.....	97
Şekil 3-26: DM grubu VEGF immunoreaktivitesi.....	98
Şekil 3-27: AGO grubu VEGF immunoreaktivitesi	99
Şekil 3-28: GAL grubu VEGF immunoreaktivitesi.....	100
Şekil 3-29: Kontrol grubuna ait testis dokusunda TUNEL boyama	103
Şekil 3-30: DM grubuna ait testis dokusunda TUNEL boyama	103
Şekil 3-31: AGO grubuna ait testis dokusunda TUNEL boyama.....	104
Şekil 3-32: GAL grubuna ait testis dokusunda TUNEL boyama	104
Şekil 3-33: Negatif kontrole ait TUNEL boyama	105
Şekil 3-34: DNaz uygulanmış testis dokusuna ait TUNEL boyama.....	105
Şekil 3-35: Gruplara göre Tunel pozitif hücre dağılım grafiği.	106
Şekil 3-36: Tübül çapı ölçüm grafiği.	109
Şekil 3-37: Bazal lamina kalınlık grafiği.	110

KISALTMALAR

AGEs	İleri glikasyon son ürünleri
AGO	Agomelatin
AMH	Anti-Müllerian hormon
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DM	Diabetes mellitus
FSH	Fölikül stimulan hormon
GAL	Gallik asit
GDM	Gestasyonel Diabetes mellitus
HcG	Human koryonik gonadotropin
Hif	Hipoksi ile indüklenen faktör
KAT	Katalaz
LH	Luteinize edici hormon
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdahit
MT	Melatonin
NBT	Nitroblue tetrazolium

NF-kB	Nükleer faktör kappa beta
NO	Nitrik oksid
NOS	Nitrik oksid sentaz
Nrf2	Nükleer faktör 2
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Fosfat tamponlu tuz
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Superoksit dismutaz
SRY	Cinsiyet belirleyici faktör
STZ	Streptozotocin
TBARS	Tiyobarbiturik asit reaktifmadde
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF α	Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM, Şeker hastalığı) eski çağlardan beri bilinen, insülin miktarının veya etkisinin yetersizliği ile oluşan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması defektleri ile karakterize hayat boyunca devam eden endokrin bir hastalıktır (1). Yunan dilinde diabetes= akıp giden (idrara) ve mellitus= tatlı (şeker) anlamını taşımaktadır (2). Kanda şeker (glukoz) seviyesi arttığında pankreastaki beta hücrelerinden insülin kana salınır. Bu hormon vücutta çeşitli hücrelerde (kas, yağ v.b) bulunan insüline duyarlı reseptörlere bağlanarak kandaki şekerin hücrelere içine girmesini ve enerji oluşmasını sağlar. Kan glukoz konsantrasyonu, ya insülin hormonunun yeterince salgılanamaması ya da yeterince salgılanabilmesine rağmen hücrelerin insüline direnç göstermesiyle glukozun hücre içine alınamaması sonucunda artmaktadır (3).

Dünya nüfusunun yaklaşık % 5'i bu hastalıktan etkilenmektedir. Yapılan tahminlere göre ülkemizin 2013-2035 yılları arasında 20-79 yaş aralığında diyabetli nüfusunun en yüksek olduğu on ülke arasında yer alacağı düşünülmektedir (4). Son yıllarda yapılan çalışmalar Diabetes mellitus hastalığının erken ve geç dönem komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Diyabet ile karakterize hipergliseminin direkt veya dolaylı olarak birçok hastalığın klinik tablosunda gözlenen serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Bu olgu dokularda diyabet patogenezinin oluşmasında büyük katkı sağlamaktadır (5-7).

Yüksek seviyelere ulaşan glukoz protein ve lipidlerle birleşerek dokularda ve damar endotelinde geri dönüşümsüz glikozilasyon son ürünleri oluşturmaktadır (8). Üretimi artan Nitrik Oksit başrol oynadığı birçok oksidan nitratlanmış ve oksitlenmiş ara ürünler oluşturarak enzim inhibisyonunun yol açtığı; doku hasarı, inflamasyona, nekroz ve apoptoza sebep olmaktadır (9, 10).

Diyabet; kalp ve damarlar (kardiyovasküler hastalıklar), böbrek (kronik böbrek yetmezliği), göz (retinopati) gibi birçok organda olduğu gibi erkek üreme sistemi üzerinde de infertiliteye kadar ulaşan birçok olumsuz etkiye sahiptir. Bu etkilerin en başında testosteron seviyelerindeki düşüş, spermatogenik serideki bozukluklar,

sperm sayısının azalması, sperm canlılığının azalması, seminal sıvının azalması ve testis doku hasarı gösterilmektedir (11).

Son yıllarda, diyabetin sebep olduğu oksidatif stres kaynaklı doku hasarının azaltılmasında antioksidan kullanımı sıklıkla araştırılan konular arasında yerini almıştır. Çalışmamızda potansiyel antioksidan, antitümöral, antiinflamatuvar etkilere sahip gallik asit araştırılmıştır. Serbest radikalleri süpürücü etkiye sahip bu antioksidan aynı zamanda lipid peroksidaz inhibitörüdür. Mitokondriyal apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapısındaki çoklu hidroksil grupları sayesinde proton sağlayarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırmaktadır (12, 13). Diyabette tedavi edici etkisini araştırdığımız diğer etken madde Agomelatin'dir. Melatonerjik reseptör agonisti olan bu madde günümüzde antidepresan preparat olarak kullanılmaktadır. Doğal bir antioksidan olan melatoninin sekresyonunu aynı zamanda onun serbest radikal koruyucu etkisinde taklit etmektedir. Hidroksil radikallerini hidrojen peroksit formuna dönüştürerek onları direkt inhibe eder. Mitokondriyel geçirgenliği arttırarak apoptotik yolların çalışmasını destekler. Mitokondriyal elektron transportunu denetleyerek reaktif oksijen türlerinin oluşmasını önler. Dolaylı olarak glutasyon seviyelerini azaltır (14-17).

Çalışmamızda kullanılan antioksidanlar olan agomelatin ve gallik asid'in diyabet üzerine etkisi ile ilgili literatürlerde oldukça kısıtlı veri bulunmaktadır. Özellikle bu ilişkinin üreme organları bazında incelendiği hiçbir çalışma yapılmamıştır. Melatonin diyabet ilişkisi kuvvetli olarak çalışılmışken farklı etkilere de sahip olan melatonin agonisti agomelatin literatürlerde yer almamaktadır. Biz de diyabette oldukça sık rastlanan infertilite ve testis disfonksiyonu üzerine katkılar sağlayabileceğini düşündüğümüz oldukça özgün olan bu çalışmayı planladık. Bu bilgiler ışığında tezimizin amacı; STZ aracılı diyabet oluşturulan erkek sıçanlarda testis dokusundaki histolojik değişikliklerin ve bu değişiklikler üzerine Gallik asit ve Agomelatinin olası tedavi edici etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılmasıdır.

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Tanım

Diabetes mellitus mide arkasında bulunan bir organ olan pankreas kaynaklı bir hastalıktır. Pankreasın langerhans adacığında bulunan beta hücrelerinden salgılanan insülin vücudun besinleri enerjiye çevirmesine aracılık eder. Diyabet olan hastalarda pankreasın yeterli insülin üretemediği ya da insülin direncinin geliştiği görülmektedir. İnsülin kanda bulunan glikozun hücrelere girişini sağlar. İnsülin işlevini yerine getirmediğinde hücreler enerjiden mağrum kalır ve kan glikoz seviyesi yükselir (18).

1.1.2 Klinik Bulgular ve Tanı

Tablo 1-1: Diyabetes mellitus'un klinik bulguları

Diyabetes Mellitus Klinik Bulguları	
Sistemik	Kilo kaybı, İnatçı enfeksiyonlar, Geç yara iyileşmesi, Kaşıntı
Merkezi Sinir Sistemi	Polidipsi, Polifaji, Halsizlik, Baygınlık
Solunum Sistemi	Hiperventilasyon
Sindirim Sistemi	Bulantı, Kusma, Karın ağrısı, Aseton kokulu nefes
Üriner Sistem	Poliüri, Glikozüri, Noktüri
Göz	Bulanık görme

Diyabet tanısı, klasik semptomlar ve komplikasyonlar var ise kolaylıkla konabilir (Tablo 1-1). Glukoz metabolizması bozukluklarının tanı ve sınıflamasında son 15 yılda önemli değişiklikler yapılmıştır. Önce 1997 yılında, Amerikan Diyabet Birliği yeni tanı ve sınıflama kriterlerini yayınlamış ve hemen ardından 1999'da Dünya Sağlık Örgütü bu kriterleri küçük revizyonlarla kabul etmiştir. 1999'da Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından 2006 yılı sonlarında

yayınlanan raporda ise 1999 kriterlerinin korunması benimsenmiştir. Buna karşılık, ADA ve Avrupa Diyabet Çalışma Birliği 2007 yılında yayınlanan son raporlarında ise 2003 yılındaki düzenlemenin değişmemesi gerektiğini savunmaktadır. 2010 yılındaki değişimler ile birlikte son tanı kriterleri aşağıdaki gibidir (Tablo 1-2) (22).

- Semptomlar ve Rastgele plazma glikozu ≥ 200 mg/dl diyabete özgü semptomların (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı v.b) varlığına ek olarak günün herhangi bir zamanında ölçülen plazma glikoz değerinin ≥ 200 mg/dl olması.
- Semptomlar ve Açlık plazma glikozu ≥ 126 mg/dl açlık (en az 8 saat) plazma glikoz değerinin 126 mg/dl (7,0 mmol/L) veya daha yüksek olması. Açlık plazma glikozunun 126 mg/dl veya daha fazla olması diyabetin kesin olmayan tanısıdır.
- Oral Glikoz Tolerans Testi ve 2.saat plazma glikozu değeri ≥ 200 mg/dl 75 gr glikoz ile yapılan oral glikoz tolerans testi sırasında 2.saat glikoz değerinin ≥ 200 mg/dl olması koşulları aranmaktadır.
- HbA1C değerinin $\geq \% 6,5$ olması (Uluslararası standardize edilmiş yöntemlerle ölçüm yapıldığında tanı testi olarak kullanılabilir, ülkemizde HbA1C ölçüm testleri standardize edilemediği için tek başına tanı testi olarak kullanılmaz).

Tanı sırasında dikkat edilmesi gereken bazı hususlarda bulunmaktadır: Hipergliseminin ve metabolik dengesizliğin belirgin olmadığı durumlarda testler tekrarlanmalıdır. Oral glikoz tolerans testinin rutin olarak uygulanması tavsiye edilmemektedir. Açlık plazma glikozu <110 mg/dl ise normal, 110-126 mg/dl arasında ise bozulmuş açlık glikozu olarak tanımlanır. Kesin tanı için oral glikoz tolerans testi yapılması gereklidir (19-21).

daha sık rastlanmakla birlikte, herhangi bir yaşta görülebilir. Tüm dünyada her yıl 50,000 yeni Tip I diyabet tanısı konulduğu belirtilmektedir. Tip I diyabetliler tüm diyabetlilerin yaklaşık % 5-10'unu oluşturmaktadır. Polidipsi, poliüri, kilo kaybı gibi diyabet belirtileri oldukça şiddetlidir. Ketoasidoz koması, hipoglisemi gibi akut komplikasyonların çok yaşandığı diyabet tipidir. Hastalığın ortaya çıkışını hızlandıran faktörler olarak bazı virüs enfeksiyonları (Retrovirüsler, Coxsackie B, Kabakulak, Rubella vs.), beslenme özellikleri, toksinler ve strese bahsedilmektedir. Ayrıca Tip I diyabete Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı, vitiligo gibi oto immün hastalıklar da eşlik edebilir. Antiglutamik asit dekarboksilaz ve anti insülin antikoları hücre yıkımına yol açan otoimmün süreci gösteren işaretlerdir. Bu antikoların varlığında hastalık erkenden tespit edilebilir. Son yıllarda yapılan araştırmalara rağmen Tip I diyabetin kesin tedavisi veya koruma yolu yoktur, fakat hastalık iyi yönetilebilir. Mevcut tedaviler ile Tip I diyabetli hastaların, geçmişteki döneme göre daha uzun ömürlü ve sağlıklı oldukları görülmektedir (23, 24).

1.1.3.2 Tip II Diabetes Mellitus

Dünyada en sık rastlanan diyabet tipidir. Tüm diyabetlilerin yaklaşık % 85-90'ı Tip II diyabetir. Tip II diyabetin çocukluk dönemi de dahil olmak üzere yaş ilerledikçe sıklığı artmaktadır. Genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkan belirtilerinin hafif hatta bazen de hiç olmadığı, komplikasyonların ise hayat boyu görüldüğü diyabet tipidir. Belirtilerin kademeli olarak ortaya çıkmasından dolayı uzun yıllar tespit edilemeyen vakalar bulunmaktadır. Tip II diyabet; obezite, dokuların insülin direnci ve insülin salgısındaki defektler ile karakterizedir. Hücreler insüline cevap sağlayamamaktadır. Hastalar hayatta kalabilmek için insülin tedavisine gereksinim göstermektedirler. İstatistiklere göre Tip II diyabet görülen hastaların çoğunluğu hastalık ortaya çıktığında obezdir. Obezitenin varlığı insülin direncini arttırmaktadır. Yağ ağırlıklı beslenme sebebiyle obezite ve hareketsiz yaşam Tip II diyabet sıklığı ile yakın ilişkilidir. İnsülin direnci; egzersiz, gıda diyeti ve ilaçlar yardımıyla düzeltilerek kan şekeri düzeyleri normale çekilebilir. Ailesel diyabet, hipertansiyon ve gestasyonel diyabet varlığı Tip II diyabet görülme riskini arttırmaktadır. Kuvvetli bir genetik yatkınlık görülsede poligenik olan bu aktarım tam olarak tanımlanmamıştır. Hastalığı etnik kökenine bakıldığında Afrikalı

Amerikalılar, Latinler, Yerli Amerikanlar, Asya ve Pasifik Adalarından gelenler dikkati çekmektedir (23, 25).

1.1.3.3 Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

İlk olarak gebelikte başlayan veya tanısı konulan glikoz intoleransıdır (26). Çoğunlukla gebeliğin 5. ayında görülmektedir. Gebelik öncesi diyabet kadınlar GDM kabul edilmemektedir. Amerikan Diyabet Derneği hamile kadınların % 4'ünde (yılda yaklaşık 135,000) GDM tespit edildiğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalarda hastalığın Kafkas ırkında % 0,4, zencilerde % 1,5 Asyalılarda % 3,5-7,3 ve Amerikalılarda %16 olarak görüldüğü bulunmuştur (27). Hastalık anne ve bebek için tehlikeli olabilmektedir. Neonatal hipoglisemi, sarılık, polisitemi ve hipokalsemi fetusta hastalığın yok açtığı istenmeyecek gelişmelerden bazılarıdır. GDM görülme sıklığını etkileyen başlıca faktörlerin; ailesel diyabet öyküsü, obezite ve anne yaşı olduğu düşünülmektedir (28).

1.1.3.4 Diğer Spesifik Diyabet Tipleri

Diğer spesifik diyabet tipleri, hastalığın Tip I ve 2'ye benzemeyen farklı özelliklerine ve mekanizmalara göre tanımlanmaktadır (Tablo 1-3) (22). Nadir diyabet formlarıdır ve hastalık tiplerinin % 1'inden daha azını oluşturur. Bu başlık altında aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi farklı nedenler ile oluşan hastalık formları toplanmaktadır (25).

Tablo 1-3: Spesifik diyabet tipleri.

<p>A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları)</p> <ul style="list-style-type: none">• 20. Kromozom, HNF-4a (MODY1)• 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2)• 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3)• 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)• 17. Kromozom, HNF-1b (MODY5)• 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6)• 2. Kromozom, KLF11 (MODY7)• 9. Kromozom, CEL (MODY8)• 7. Kromozom, PAX4 (MODY9)• 11. Kromozom, INS (MODY10)• 8. Kromozom, BLK (MODY11)• Mitokondriyal DNA• 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu)• Diğerleri <p>B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler</p> <ul style="list-style-type: none">• Leprechaunizm• Lipoatrofik diyabet• Rabson-Mendenhall sendromu• Tip A insülin direnci• Diğerleri <p>C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları</p> <ul style="list-style-type: none">• Fibrokalkülöz pankreatopati• Hemokromatoz• Kistik fibroz• Neoplazi• Pankreatit• Travma/pankreatektomi• Diğerleri <p>D. Endokrinopatiler</p> <ul style="list-style-type: none">• Akromegali• Aldosteronoma• Cushing sendromu• Feokromositoma• Glukagonoma• Hipertiroidi• Somatostatinoma• Diğerleri	<p>E. İlaç veya kimyasal ajanlar</p> <ul style="list-style-type: none">• Atipik anti-psikotikler• Anti-viral ilaçlar• b-adrenerjik agonistler• Diazoksid• Fenitoin• Glukokortikoidler• α-İnterferon• Nikotinik asit• Pentamidin• Proteaz inhibitörleri• Tiyazid grubu diüretikler• Tiroid hormonu• Vacor• Diğerleri (post transplant diyabet) <p>F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları</p> <ul style="list-style-type: none">• Anti-insülin reseptör antikolarları• “Stiff-man” sendromu• Diğerleri <p>G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar</p> <ul style="list-style-type: none">• Alström sendromu• Down sendromu• Friedreich tipi ataksi• Huntington korea• Klinefelter sendromu• Laurence-Moon-Biedl sendromu• Miyotonik distrofi• Porfiria• Prader-Willi sendromu• Turner sendromu• Wolfram (DIDMOAD) sendromu• Diğerleri <p>H. İnfeksiyonlar</p> <ul style="list-style-type: none">• Konjenital rubella• Sitomegalovirus• Koksaki B• Diğerleri (adenovirus, kabakulak)
--	--

1.1.4 Epidemiyoloji

Diyabet hastalığının öneminin anlaşılması için epidemiyolojinin bilinmesi gereklidir. Diyabetik bireylerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 40 yıl önce 10 milyon diyabet hastasının olduğu bilinmekteydi. 1982 yılında hasta sayısının yarıyarıya arttığı rapor edilmiştir. Diyabet hastalığının epidemiyolojisinin, ülkeler ve toplumlar arasında oldukça çeşitli olduğu görülmektedir. Bu durum, genetik ve çevre faktörleri, sosyal ve ekonomik düzey ve araştırma metotlarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Diyabet özellikle Tip II olmak üzere gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranlarda görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, 2000 yılında tüm dünyada en az 171 milyon diyabet hastası bulunmaktaydı. Bu yıl itibarıyla en çok diyabet hastasına sahip beş ülke; 31,7 milyonla Hindistan, 20,8 milyonla Çin, 17,7 milyonla ABD 8,4 milyonla Endonezya ve 6,8 milyonla Japonya olmuştur. 2030 yılında yaklaşık 330 milyon kişinin diyabet hastası olacağı ve en fazla Asya ve Afrika ülkelerinde görüleceği tahmin edilmektedir. Hindistan yaklaşık 80 milyon kişi ile 2030 yılında en fazla diyabet görüleceği tahmin edilen ülkedir. Bu ülkeyi 40 milyon kişi ile Çin ve 30 milyon kişi ile de Amerika Birleşik Devletleri izlemektedir (29).

Amerikan Diyabet Birliği, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri tarafından, 2000 yılından sonra doğan her Amerikalı erkeğin 3 te 1'i ve her kadının 5 te 2'sinin hayatları boyunca diyabete yakalanacakları değerlendirilmesine dikkat çekmektedir (30).

Ülkemizde en çok bilinen çalışma "Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması" (TURDEP) olup; 20 yaş ve üzerinde, toplam 47,467 kişiden 6,503 diyabet hastasının olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada 13,812 kişilik prediyabetik bir nüfusun olduğu ortaya çıkarılmıştır. Türkiye için 2030 yılında % 9,7'e ulaşması beklenen diyabet oranının 2010 yılında aşıldığı bu çalışma ile gösterilmiştir (31).

1.1.5 Komplikasyonlar

1.1.5.1 Akut Komplikasyonlar

1.1.5.1.1 Ketoasidoz

Tip I diyabette oldukça sık görülmektedir. Ağır insülin yetersizliği ve zıt olarak insülin karşıtı hormonların (glukagon, adrenalin, growth hormon ve kortizol) salınımlarının artışı sonucu oluşan bir komplikasyondur. İnsülin eksikliğine bağlı olarak; keton yapılma hızı, karaciğer ve diğer dokulardaki yıkılma hızından fazla olduğu için ketonemi ve ketonüriye görülür. Hızlı ve derin solunum, nefeste aseton kokusu, dehidratasyon, şuur kaybı, karın ağrısı, halsizlik görülebilir. Laboratuvar bulguları arasında hiperglisemi, hiperketonemi, düşük serum bikarbonat düzeyi, idrarda glukoz ve keton cisimleri artışı mevcuttur. Tedavide insülinle birlikte sıvı, fosfat ve potasyum, desteği yapılır (1, 32).

1.1.5.1.2 Laktik Asidoz

Laktik asidoz, vücutta laktik asit konsantrasyonunun artmasıdır. Glukoz dışı yakıt kullanan hücreler laktik asit üretirler. Vücutta çok fazla laktik asit kalması ile oksijen kullanımında yetersizlik görülür. Bu durum özellikle Tip II diyabetli kişileri etkilemektedir. Laktik asidoz kanda laktat konsantrasyonunun arttığı durumlarda görülen bir asidozdur (1).

1.1.5.1.3 Hipoglisemik Koma

İnsülin alımı sonrası yeterli besin alınmaması veya egzersiz yapılması ayrıca aşırı insülin alımı ile oluşabilir. Baş ağrısı, terleme, taşikardi, uyuşmaya ve komaya kadar farklı bulgular gözlenir. Tedavi için oral veya intravenöz glikoz uygulaması yapılır (1).

1.1.5.2 Kronik Komplikasyonlar

Diyabetin ileri evrelerinde görülen ve ciddi problemlere neden olan durumlardır. Sinir sistemi başta olmak üzere kas, gözler, böbrekler ve vasküler dokularda hasara sebep olmaktadır (1).

1.1.5.2.1 Nefropati

Son yıllardaki böbrek yetmezliklerinin önemli bir nedenidir. Diyabet hastalarının yaklaşık % 4-8'inde görülmektedir. Tip I ve Tip II diyabette görülen nefropati olgularının sayısı neredeyse aynıdır. Böbrekte görülen en belirgin lezyon mikrovasküler bir komplikasyon olan interkapiller glomerülosklerozdur. Nefropatinin seyri glomerüler hiperfiltrasyon, sessiz evre, mikroalbuminüri evresi, makroalbuminüri evresi ve son dönem böbrek yetmezliği olarak ilerler. İlk evrede kan akışı hızının artmasına bağlı olarak böbreklerde büyüme görülebilir. Daha sonra nefropatinin klinik bulgularından en önemlisi mikroalbuminüri gözlenmektedir. Makroalbuminüri evresinde böbrek toksinleri temizleyemez ve kanda üre miktarında artış gözlenir. Diyaliz veya böbrek nakline ihtiyaç duyulmaktadır.

Ayrıca hiperglisemi böbrekte intraglomerüler basınç artışına sebep olabilir. Böylece bazal membranda hasar ve mezangiumda protein depolanması gözlenir. Olgunun ilk belirtisi proteinürüdür (32).

1.1.5.2.2 Retinopati

Retinada insülin yetersizliği sonucu ortaya çıkan mikrovasküler yapılar olarak tanımlanmaktadır. Uzun süren hiperglisemi retinada proteinlerin enzimatik veya enzimatik olmayan glikozilasyonunu tetikleyerek metabolik anormalliler oluşmaktadır (33) Protein kinaz C aktivasyonu, anjiyotensin enzim ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ifadesi metabolik karmaşaya yol açmaktadır. Bunun sonucunda; endotelial bazal membran kalınlaşması, kapiller endotel, ve perisit hücre hasarı, endotelial proliferasyona ve trombosit fonksiyon bozuklukları oluşabilmektedir. Diyabet hastalarında kan viskozitesindeki artış sonucunda retinada kapiller tıkanıklıklar ile vasküler geçirgenlikte artış ve kanamalar ortaya çıkabilir.

Gelişmiş ülkelerde en önemli körlük nedenidir. Retinopatinin diyabet hastalarının % 25'inde var olduğu tahmin edilmektedir. Diyabetik retinopatinin gelişmesinde en önemli olgu diyabetin süresidir. Tip I diyabeti olan hastalarda 5 yıldan önce diyabetik retinopati riski nadirdir. İkinci 5 yılda bu oran % 27, daha uzun süre diyabeti olanlarda ise % 71-90 retinopati gözlenir. Wisconsin diyabetik retinopati çalışmasına göre başlangıçta retinopati olmayan Tip I Diyabet hastalarının ondört yılsonunda % 96 oranında retinopati geliştirdiği saptanmıştır. Diyabetik retinopati gelişiminde diğer risk faktörleri; renal bozukluk, gebelik, sigara kullanımı olarak gösterilebilir (34, 35).

Diyabetik retinopatisi olan bireylerde 5 yıl içerisinde nefropati gelişme riski % 50, 12 yıl sonunda ise %75'tir (36).

1.1.5.2.3 Nöropati

Nöropati, diyabetin en uzun seyirli ve en çok mortaliteye sahip komplikasyonlarından biridir. Diyabet hastalarında yaşam boyu % 60-70 oranlarında nöropati gelişmektedir. Hastalar arasında çok yaygın bir problem olduğu halde, diyabetli hastaların birçoğu durumlarının farkında değildirler. Nöropati cilt, kas, ter bezleri, mesane, mide-bağırsal ve kan damarları gibi birçok organı etkileyebilmektedir. Ayrıca ağrı yapması dışında bozukluğu, depresyon ve anksiyeteye yol açmaktadır. Schwann hücrelerinde oluşan işlev yetersizliği ilesinir ileti hızının yavaşlaması sonunda miyelinizasyon hasarları ve akson dejenerasyonları oluşur. Otonom nöropati periferik nöropatiye göre daha az görülür. Yüz felci, göz kapaklarında düşüklük, mesanenin tam boşalamaması, idrar ve dışkı tutamama, kas güçsüzlüğü klinikteki önemli sorunlar arasındadır. Diyabet hastaları arasında çok yaygın bir problem olduğu halde, diyabetli hastaların birçoğu durumlarının ya farkında değil ya da rahatsız değildirler (32).

1.1.5.3 Vasküler Komplikasyonlar

Diyabetik hastalarda koroner arter hastalıkları oldukça yaygındır. Nöropatiye benzer şekilde mortalite oranı yüksektir. Genellikle diyabetin sebep olduğu arteroskleroz sebebiyle miyokard infarktüsler görülmektedir. Otonom nöropati

sebebiyle oluşan ağrısız miyokard infarktüsler kalpte bölgesel fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır.

Periferik arter hastalığının sonucu olan iskemi, aşırı basınç ve enfeksiyonlar ile birlikte “Diyabetik Ayak” olarak bilinen vasküler hastalığa yol açmaktadır. Periferik arter hastalıkları, bacak ve ayak amputasyonları yüksek oranlarda görülmektedir. Oluşan organ kayıpları ruhsal, bedensel, sosyal ve ekonomik komplikasyonlarada yol açmaktadır (24).

1.2 Deneysel Diyabet Modelleri

Günümüzde birçok hastalığın patogenezinin ve mekanizmasının anlaşılması, hastalıktan korunma, tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel hayvan modelleri oldukça yaygındır (53). Pozitif ve negatif kontrollerin kullanımı, araştırılan patolojiye uygun hayvan türlerinin genetik olarak seçilebilmesi, anlamlı istatistikler sağlayacak sayıda örnek çalışılabilmesi, hayvan modellerini nitelikli hale getiren olgulardır.

Pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği veya dokuların insüline cevabının yetersizliği ile oluşan DM oldukça kompleks bir hastalıktır. Diyabette de fizyolojik ve patolojik değişikliklerin anlaşılabilmesi ve potansiyel tedavi mekanizmalarının geliştirilebilmesi amacıyla deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Deneysel diyabet oluşum modelleri için fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları yaygın olarak kullanılmaktadır (54-58). Hayvanlarda deneysel diyabet oluşturulması kimyasal ajanlarla (54),spontan olarak (59, 60) veya virüs aracılı (61, 62) yapılmaktadır. Diyabet modellerinde kimyasal ajan olarak sıklıkla alloksan ve streptozotosin (STZ) kullanılmaktadır. Alloksan, monohidrat [2,4,5,6(1H,3H)-pyimidinetetron] yapısında bir ürik asit türevidir, suda kolayca erir (63). Selektif olarak pankreas beta hücrelerini hasarlayarak insüline bağımlı diyabete neden olduğu bildirilmiştir (54). Alloksan ile diyabet oluşturulmasında distile su veya serum fizyolojik içerisinde çözülmüş alloksanın, sıçanlara intraperitoneal yolla 120 mg/kg dozunda üç gün üstüste uygulanmasıyla veya 150 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla bir kez uygulanmasıyla oluşturulmaktadır. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabetli kabul edilir (64). Kimyasal ajanlarla diyabet oluşumunda kullanılan

diğer bir yöntem ise streptozotosin (STZ)'dir. Streptozotosin (streptozocin, STZ) N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır. Nötral pH'da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için pH'sı 4-4,5 olmalıdır. Bu nedenle STZ çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır (65) Pankreas β hücrelerini hasarlayarak Tip I ve Tip II diyabete neden olmaktadır (66). Yetişkin sıçanlarda tek doz (40-60 mg/kg) intraperitoneal veya damar içi STZ uygulaması insüline bağımlı diyabete (67), yeni doğmuş sıçanlara tek doz intraperitoneal veya intravenöz yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının ise insülininden bağımsız diyabete neden olduğu bildirilmiştir (68).

Genetiği değiştirilerek elde edilmiş olan Tip I diyabet hayvan modellerinde diyabet kendiliğinden gelişir ve yaşamlarını sürdürebilmek için dışarıdan insülin alınmasına ihtiyaç duyulur. Tip I diyabetin viral yolla da oluşturulabilmesi, insanlarda çevresel faktörler kaynaklı diyabet oluşumunun daha iyi anlaşılmasına imkan tanımıştır (69).

Diyabet hayvan modellerinde kimyasallar seçici olarak β hücrelerine hasar vererek, insülin üretimi ve salgılanmasını inhibe ederek ve insülinin etkisini hedef organlarda azaltarak etki göstermektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda STZ'nin alloksandan daha çok tercih edildiği görülmektedir. Bu tercihin nedeninin STZ'nin β hücrelerine karşı daha seçici olması (70), STZ ile diyabet oluşturulan hayvanlardaki mortalitenin daha az olması (71) ve vücuttaki yarılanma ömrünün 15 dakika gibi uzun bir süre olması özelliklerine bağlanmaktadır (73).

STZ, *streptomyces achromogenes* toprak bakterisi tarafından üretilen bir antibiyotik. Yüksek reaktif özellikteki nitrozüre yan zinciri pankreatik β hücresi membran reseptörlerine bağlanarak yapısal ve hücre içi hasar oluşturur (73). STZ aynı zamanda intraselüler seviyede de hasar meydana getirir (75).

Alkilleyici bir ajan olan STZ; DNA'nın farklı bölgelerindeki bazıları alkilleyerek kırıklar meydana getirir (75). DNA tamirinde görevli polisintetaz enzimleri aktif hale geçer. Fakat bu enzim NAD^+ 'a ihtiyaç duyar ve hücrede bulunan NAD^+ 'ların buraya aşırı yoğunlaşması ile enerji metabolizması kesintiye uğrar ve hücre ölür. STZ'nin in vivo ve in vitro uygulanması ile pankreatik hücrelerde

hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturarak oksidatif stres yarattığı görülmüştür. Ayrıca STZ'nin β hücrelerinde NO seviyesini arttığı ve hücre ölümüne sebep olduğuda düşünülmektedir (76).

1.3 Diyabet ve Oksidatif Stres

Birçok hastalığın patogeneğinde olduğu gibi DM'nin sebep olduğu komplikasyonlarda da oksidatif stres önemli bir yere sahiptir. Protein glikasyonu ve ilerlemiş glikozilasyon son ürünlerinin oluşumu, glikoz oto-oksidasyonu ve superoksid üretimi; lipid peroksidasyonuna neden olabilen serbest radikalleri meydana getirmektedir (10).

Serbest radikaller lipidlerle reaksiyona girerek mitokondri ve endoplazmik retikulum membran bütünlüğünün kaybına, proteinler ile reaksiyona girerek proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek genetik mutasyonlara sebep olmaktadır. Canlıda antioksidan mekanizmasının zayıflamasına sebep olan bu hastalık organizmayı zararlı etkilere açık hale getirmektedir (76, 77).

1.3.1 Serbest Radikaller

Çiftleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir (78). Oksijen kaynaklı olarak oluşmaktadır. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulundurulur. Serbest radikaller kovalent bağ taşıyan bir molekülün homolitik yıkımı veya bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi sonucu, bir molekülden tek bir elektronun kaybıyla, bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu oluşabilir. Pozitif, negatif veya nötral yüklü olabilirler (79). Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi bağışıklık hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (80). Biyolojik sistemlerdeki başlıca reaktif oksijen türleri; süperoksit anyonu ($2O^{2-}$), hidroksil radikali ($HO\cdot$), nitrik oksit ($NO\cdot$), peroksit radikali ($ROO\cdot$), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikallerdir (81).

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) lipid hidroperoksidler, konjuge dienler ve isoprostanlar gibi oksidatif stres göstergelerinin düzeylerinin arttığı diyabetli hastalarda E ve C vitaminleri, glutatyon, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan parametrelerin miktarının azalması diyabetin kronik komplikasyonları arasında yer almaktadır (82-85).

Diyabetteki vasküler komplikasyonlarda görülen endotel fonksiyon bozukluklarından nitrik oksid üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. Ancak diyabetteki azalmış endotel bağımlı vazodilatasyona NO üretiminin azalması mı, yoksa oksidatif stresin mi neden olduğu tartışmalıdır (86, 87).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar '*antioksidan savunma sistemleri*' olarak adlandırılır (Tablo 1-4).

Tablo 1-4: Antioksidan savunma sistemleri.

<i>Süpürücü Antioksidanlar</i>	<i>Enzimatik Antioksidanlar</i>	<i>Sentetik Antioksidanlar</i>	<i>Preventif Antioksidanlar</i>
Askorbik asit	Katalaz	N-asetilsistein	Transferrin
Alfa-tokoferol	Paraoksonaz	Allopurinol	Albumin
Tiyoller	Süperoksit	Probakol	Seruloplasmin
Beta-karoten	Glutatyon	Penisilamin	Ferritin
Ürik asit		Deferoksamin	
Flavonoidler		Butil-	
Ko-enzim Q		Hidroksitoluen	

Antioksidanlar temel olarak dört farklı mekanizmayla ROS'ları etkisizleştirmektedir.

- *Scavenging (Süpürme) etkisi:* Enzimler tarafından yapılı ve oksidanlar etkisiz bir moleküle çevrilir.

- *Quencher (Susturma-baskılama) etkisi:* Vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır. Oksidanlar bir hidrojen aktarılarak etkisiz hale getirilir.
- *Onarma etkisi:* Oksidatif hasar görmüş biyomoleküller onarılır.
- *Zincir koparma etkisi:* Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklindeki bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (77, 88, 89).

Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmasıdır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum enzimlerin işlevi için gereklidir (90).

Serbest radikallerin oluşum mekanizmalarının öğrenilmesi tedaviye yönelik yaklaşımlarda oldukça önemlidir.

1) Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Elektron taşıma zincirinde meydana gelen oksidatif fosforilasyonda yer alan glukozun oksidasyonu enerji üretiminde görev alan indirgenmiş nikotinamid dinükleotid (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) üretimini sağlar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi için kullanılır. Glukoz bir geçiş elementinin varlığında reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Mitokondride gerçekleşen bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Diyabette olduğu gibi yüksek glukoz konsantrasyonunda süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Yapılan çalışmalardan birçoğu diyabetteki patolojileri mitokondriyal ROS üretimi ile ilişkilendirmektedir (91-93)

2) Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (İlerlemiş glikasyon son ürünleri) Oluşumu

İlerlemiş protein glikasyonu ve bunların son ürünlerinin birikimi hücre ve dokulara zarar veren önemli etkenlerden biridir. Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında enzim ilişkili olmadan kontrolsüz glikasyon göstermektedirler. Glikasyona uğramış proteinler, moleküler oksijene bir elektron

vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (94). Enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) ara ürünleridir. Amadori ürünleri son aşamada çapraz bağlar ile birleşerek AGE'lere dönüşür (95). AGE'ler, vazokonstriksiyonu artırarak endotel hasarına yol açar. Ayrıca potansiyel serbest radikal üretebilme kapasitesine sahiptirler. Proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilirler, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilirler ve sonuçta nükleer faktör kapp B (NF-kB) gibi faktörleri aktive ederek doku hasarına sebep olabilirler (96). Araştırmalar AGE'ler ve serbest radikallerin karşılıklı olarak birbirlerinin üretimini arttırabildiğini göstermektedir (97). Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği ve bu sayede vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matris bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonlara yol açtığı öne sürülmektedir (98, 99).

3) Sorbitol (Poliol) Yolu

Sorbitol-aldoz redüktazyol izi olarakta adlandırılmaktadır. Yüksek glukoz konsantrasyonunun bir dezavantajıda polioliol yolu ile sorbitol üretimine neden olmasıdır. Bu yol izi aktive olduğunda NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Glutasyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesini sınırlandırır (99). Vazodilatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonöronal hipoksi ve iskemiye yol açabilir. Bu sinir hücrelerinde hasar meydana getirebilir. Glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu sinir iletim hızı içinde önemlidir. Hücrelerde biriken sorbitol hücre membranlarından kolayca geçemez. Artan ozmotik basınca önlem olarak hücre içerisine su girişi olur. Diyabette meydana gelen retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogenezi bu nedenlerle açıklanmaktadır (100-105).

1.4 Diyabet ve Testis

Diyabet hastalarında infertilitenin oldukça yüksek olması bilinen bir gerçektir (106, 107). Hastalığın testislerde izlenen komplikasyonları oksidatif strese bağlansada altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. İlk olarak 1943 yılında İskoç Androlog John MacLeodoksijen varlığında sperm hareketliliğinin azaldığını göstermiştir. Enerji üretimi için kullanılan oksijenin bir yan etkisinde ROS üretimidir. Ejakulatta ROS'un mevcudiyeti oksidatif stresin erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunun klinik bir kanıtıdır (108, 109).

Testiküler dokuda düşük oksijen bulunmasına rağmen yüksek miktarda doymamış yağ asitlerin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı testisi oksidatif strese hassas hale getirmektedir (110). Yoğun kanlanan bir organ olan testis; üreme yeteneğini korumak amacıyla antioksidan mekanizmalar ile korunmasına rağmen bazı etkenlerin bu savunmayı aşarak oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Oksidatif stres sonucunda testislerde torsiyon, varikozel ve enfeksiyonunda desteklediği doku hasarları izlenmektedir. Oksidatif stres, erkek infertilite etiolojisinde en önemli faktördür. Spermatozoonların karşılaştığı ROS saldırılarının; lipid peroksidasyonunu indüklediği DNA fragmentasyonunu sebep olduğu, hücrelerin bozduğu görülmektedir.

Oksidatif stresin testislerde direkt oluşturduğu hasar dışında androjen üretim düzeylerinde değişiklikler meydana getirerek üreme siklusuna etki ettiği de bilinmektedir (111-113). Günümüzde bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde diyabetin tunika albuginea, seminifer tubül (spermatogenik seri ve sertoli hücreleri), interstisyel bağ dokusu ve leydig hücrelerini etkileyerek proliferasyon yeteneği, testiküler sperm sayısı, ve testiküler ağırlık değerlerinde belirgin farklılıklar yarattığı gözlenmektedir. Diyabetik sıçanların testiküler germ hücre apoptozisinde artış gözlenmektedir (114).

Testiste serbest radikalleri etkisiz hale getirmeye çalışan antioksidan savunma sistemlerinin dengesi serbest radikaller lehine bozulduğunda oksidatif hasarı azaltabilecek antioksidan diyetlerin dışarıdan alınması önerilmektedir. Uygulanan antioksidan terapi spermin kalitesini ve doku hasarını arttırmaktadır (115).

1.5 Testis Anatomisi

Testisler fetal hayatta karın boşluğu içindedirler, doğum öncesinde kanalis inguinalisten geçerek skrotuma inerler. Bu iniş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Anatomik olarak funikulus spermaticus ile asılı halde bulunmaktadır. Erişkin insanda, testis oval yaklaşık 4-5 cm uzunlukta, 2,5-3,5 cm genişlikte, 3 cm çapında ve 20-30 g ağırlığındadır. Erkek üreme hücrelerini ve erkek cinsiyet hormonları olan androjenleri üretir. Testisler dıştan içe doğru ince, pigmentli ve seyrek kıllarla kaplı deri ve altında ince bir düz kas lifi (Tunica dartos) tabakasından oluşmaktadır. Ardından gallaudet fascia'nın karındaki devamı olan fascia spermatica externa yer almaktadır. Devamında cremaster tabakası M.obliquus abdominus internus'un liflerinin aşağı doğru devamını oluşturur. Karındaki fascia transversalisin devamı olarak görülen fascia spermatica internanın ardından iki tabakadan oluşan periton uzantısı tunica vaginalis vardır. Bu iki tabakadan Lamina visceralise epididimis ve testisin büyük kısmını kaplar ve arkadan skroyumun iç yüzüne girer. Lamina parietalistestisi tamamen kaplar. İki tabaka arasındaki boşluğa cavitas tunica vaginalis denir.

Testisin arterleri aorta abdominalisin dalı A. Testicularis, venleri ise testisin arkasından çıkarak Plexus pampiniformisi oluşturur. Abdomende plexus tek vena testicularis halini alır. Sağ taraf V.cava inferior'a, sol taraf V.renalis sinistra'ya dökülür. Testisin sinirlenmesinde funiculus plexus testicularis, plexus hypogastricus ve plexus vesicalis görevlidir (37).

1.6 Testis Embriyolojisi

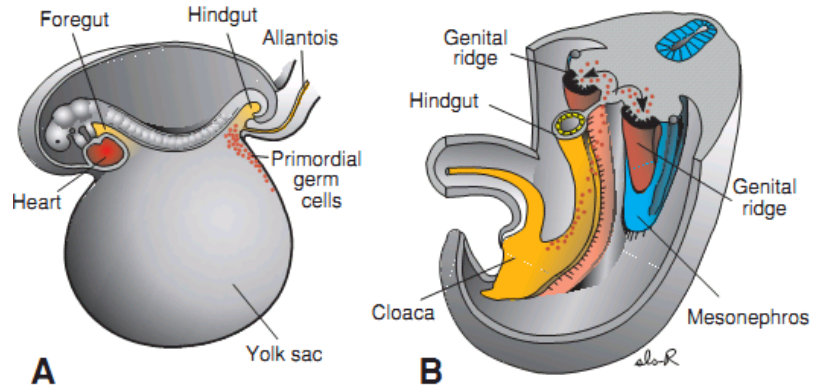
Erkek veya dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonun 7. haftasından sonra gelişmeye başlar. Testisler; posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel, altındaki mezenşim ve primordiyal germ hücrelerinden köken alır.

Gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Epitele ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde gonadal kabarıntı oluşur. Gonadal kordonlar parmak şeklinde altındaki mezenşim içerisine doğru büyürler. Farklanmamış gonad bu aşamada, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır (38). Bu yapı Wilms tümörü geni (WT1) ve steryodogenik

faktör 1 (SF1) gibi genlerin aktivasyonu sonucu gerçekleşir (39). Embriyo XX seks kromozomuna sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma differensiyel olurken, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksine sahipse medulla testise farklılaşır, korteks ise dejenere olur.

1.6.1 Primordiyal Germ Hücreleri

Sferik şekilli germ hücreleri 4. hafta vitellus kesesiduarında, allantoisin başlangıcına yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar (Şekil 1-1) (41). Embriyo katlanmaları sırasında, primordiyal germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteri boyuna gonadal kabarıntılara göç ederler (38). Göç eden ve çoğalan primordiyal germ hücrelerinin plazma membranı alkalin fosfatase enzimidengindir. Primordiyal germ hücrelerinin göçü bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörünün ona uyan hücre membran ligandı olan kök hücre faktörü ile etkileşimine bağlıdır. Hem c-kit reseptörü hem de kök hücre faktörü, göç rotası boyunca primordiyal germ hücreleri tarafından üretilir. Kök hücre faktörünün ya da c-kit reseptörünün eksikliği, primordiyal germ hücreleri bakımından gonad yetersizliği ile sonuçlanmaktadır (40). 6. haftada altındaki mezenşim içine girip gonadal kordonlara dahil olurlar. Primordiyal germ hücrelerinin göçü özellikle kemik morfojenik proteini 4 tarafından düzenlenir (38).



Şekil 1-1: A) 3 haf. embriyoda, yolk kesesi duvarında ki primordiyal germ hücreleri, B) Primordiyal germ hücrelerinin, genital sırta doğru giden göç yolu.

1.6.2 Cinsiyetin Belirlenmesi

Erkek fenotipi için gerekli olan testisin farklılaşmasında, Y kromozomunun kısa kolunda bulunan SRY geni etkili olur. Bu farklılaşmayı testisdetermining faktör (TDF) sağlar. TDF'nin etkisiyle gonodal kordonlar, seminiferöz kordonlara farklırlar. Y kromozomunun kısa kolundaki SRY geni ve SOX9, FGF9 ve DAX1 gibi diğer testis belirleyici genlerin aktivasyonu bu farklılanmada etkilidir (42). Y kromozomunun yokluğunda testis oluşumu inhibe olur ve ovaryum gelişir.

1.6.3 Testisin Gelişimi

TDF gonadal kordonları uyararak farklılanmamış gonadın medulla derinlerine doğru ilerlemesini sağlar. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparak rete testisi oluşturur. Kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra seminiferöz kordonlar yüzey epiteli ile olan bağlantılarını kaybederler. Genişleyen testis kademeli olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve asılı hale geçer. Seminiferöz kordonlardan farklılaşma ile seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testis oluşur.

Seminiferöz tübüller, interstisyel Leydig hücrelerini oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, testesteron ve androstenedione salgılamaya başlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitalerin erkek cinsiyetine farklılanmalarını sağlar. Testosterona ilaveten, fetal testisler glikoprotein yapılı bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) ve müllerian inhibitör madde de salgırlar. Testosteron üretimini HCG stimüle eder. AMH'yı Sertoli hücreleri salgırlar. Bu hormonun salgısı puberteye kadar devam eder yaşın artması ile azalır. Uterus ve tuba utrinallara farklılanan paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar.

Seminiferöz tübüller puberteye kadar katı haldedir ve lümenleri yoktur. Puberte sonrası lümen gelişir. Seminiferöz tübül lümeninde destek hücreleri olan sertoli hücreleri ve primordiyal germ hücrelerinden farklılanan spermatogonia hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunur. Fetal testiste, sertoli hücrelerinin seminifer tübüllerde sayısı oldukça fazladır. Daha sonra testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktulileri

oluşturan, 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler de duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (43, 41).

Testislerin inguinal kanallardan skrotuma inişi, 26. hafta başlar ve 2-3 gün devam eder. Yeni doğanların % 3'ünde testislerde inguinal herni gözlenmektedir (38).

1.7 Testis Histolojisi

Testisler haploid erkek gametin (spermatozoa) üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından ayrıca androjenlerin (erkek seks hormonları) üretiminden sorumludur.

Erkek üreme sistemi; spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanalları oluşturan epididimis, vaza deferens, ejakülatuar kanal ve erkek uretrasının bir parçası, semeni oluşturan ve spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretal bezler ve çiftleşme organı penisten oluşur.

Üretilen erkek gametlerin sıcaktan etkilenmemesi için testisler skrotum içinde yer alırlar. Vücut ısısından yaklaşık 2-3°C düşük ısıda olan testisler spermatogenez için uygun şartları sağlarlar (40). Testis rete testisin yer aldığı yerde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur ve tunika albuginea ile çevrelenir (44). Testis dokusu septumlarla bölünmüş 250-300 lopçuktan oluşur. Her lopçuk 1-4 seminifer tübül içerir. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapta ve 80 cm uzunlukta; iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini toplayan kanallar ağıdır (40).

Seminifer tübül merkezinde bir lümene sahip iki belirgin hücre tipi ile döşelidir. Bunlar somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleridir (spermatogonyumlar, spermatisitler ve spermatidler). Seminifer epitel çevresinde bazal membran, kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücreleri bulunur (Şekil 1-2) (40, 45).

Miyoid hücreler testis içerisinde hareketsiz olan spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılmalardan sorumludur. Spermier epididimde hareket kazanır. Organdaki

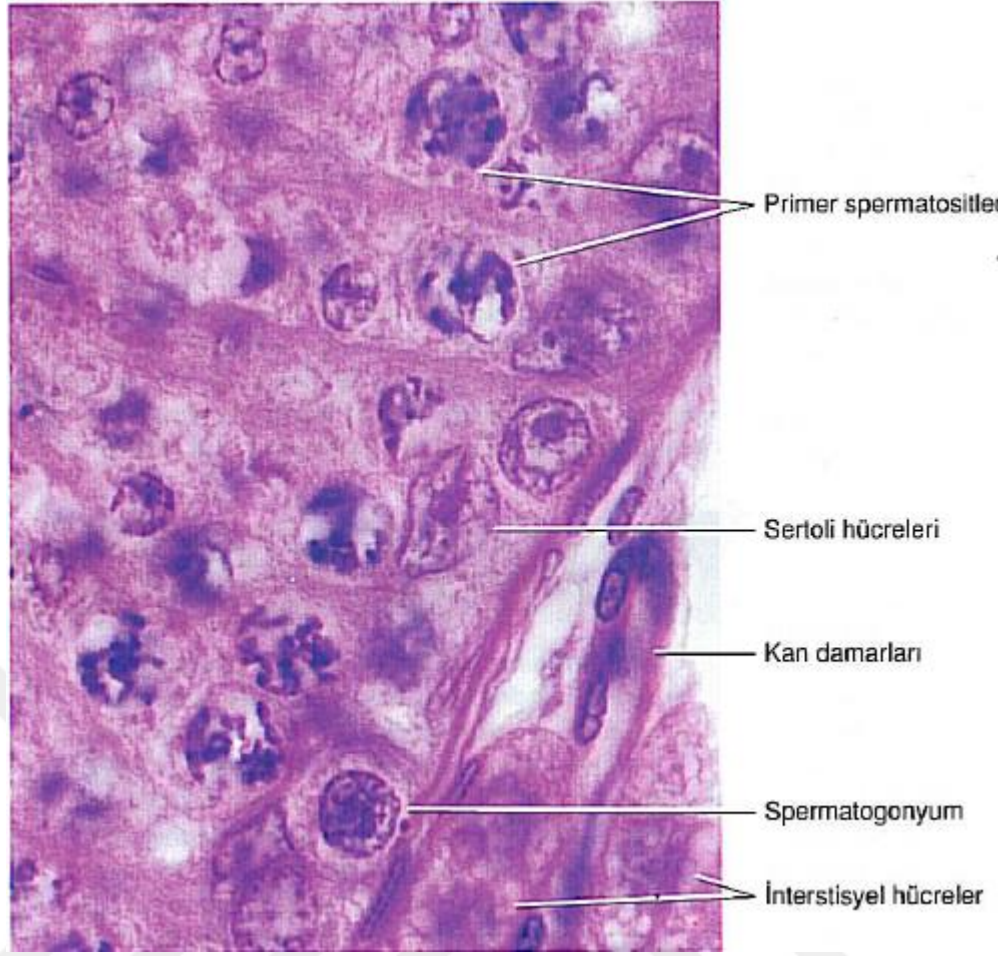
interstisyel bağ dokusunda, kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve Leydig hücreleri bulunur (Şekil 1-3)(46).

1.7.1 Sertoli Hücreleri:

Bazal lamina ve seminifer tübül lümeni arasında uzanan yüksek prizmatik hücrelerdir. Puberteye seminifer tübülde dominant hücre tipiyken puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık % 10' unu oluşturur. Seminifer tübül lümeni arasında köprü görevi görür.

Gelişmekte olan spermatogenik hücrelere kriptalar sağlayarak ev sahipliği yaptıkları için apikal ve lateral hücre membranlarının düzensiz sınırları vardır. Nükleus olukludur ve heterokromatin kitleleri ile ilişkili geniş bir nükleolus içerir. Sitoplazmasında düz ve granüllü endoplazmik retikulum, mitokondriler, lizozomlar, lipid damlacıkları, yaygın bir golgi kompleksi ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) bulunur (40).

Bazolateral bölgelerinde, seminifer tübülü bazal ve adluminal kompartmana bölensıkı bağlantılar bulunur. Bu bağlantılar gelişmekte olan spermatozoidleri ve spermatozoidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerini oluşturur. Bölünen spermatogoniumların lümenine doğru ilerlemesi için sıkı bağlantılar bozulur ve daha sonra tekrar oluşurlar (40,45-47).



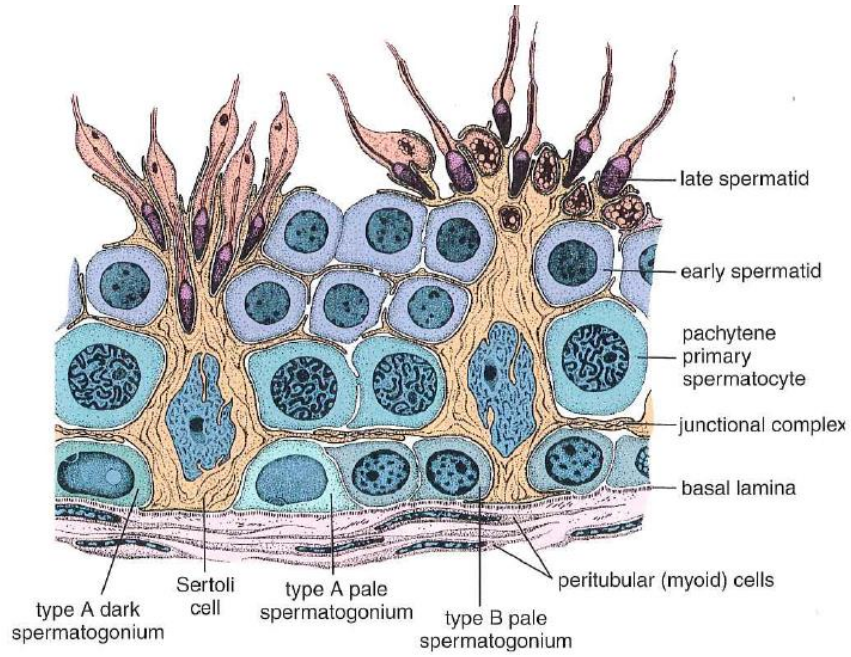
Şekil 1-3: İnterstitial hücreler ve seminifer epitel hücreleri.

1.7.2 Spermatogonyumlar

Bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogonik hücrelerdir. Spermatogonyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan mitotik hücre bölünmeleri geçirirler. İki temel spermatogonyal hücre tipi gözlenmektedir. Tip A spermatogonyum (insan testislerinde A koyu ve A açık spermatogonyumlar) ve Tip B spermatogonyumlardır (Şekil 1-4) (46).

Spermatogonyal kök hücreler ve bunların ürettiği progenitör tip A spermatogonyumları morfolojik olarak ayırt etmek oldukça zordur. Spermatogonyal kök hücreler kısmen sessiz bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Radyoterapi veya antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasından

sonra, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler. Ayrıca postmitotik Sertoli hücreleri bu tedavilere yüksek oranda dirençlidirler.



Şekil 1-4: Seminifer tübül ve spermatogenik seri hücreleri.

1.7.3 Spermatisitler

Spermatisitler iki mayotik hücre bölünmesi geçirirler ve Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Mayoz bölünmelerin tamamı kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir.

Tip B spermatogoniumların farklılaşması ile oluşan primer spermatisitler iki adet sekonder spermatisiti oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye (redüksiyon bölünmesi) girer. Primer spermatisitler spermatogenik serideki en büyük hücrelerdir. Sekonder spermatisitler ise oldukça hızlı bir şekilde interfaz aşaması girerek ikinci

mayoz bölünmeyi (eşitleme bölünmesi) geçirirler. Sekonder spermatozoid artık herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm şeklinde olgunlaşan iki adet spermatid meydana getirir. Meydana gelen spermatidler haploiddir. Spermiyogenez denilen karmaşık bir farklılaşma sürecini ile spermium haline gelirler

İkinci mayoz bölünmenin interfazı çok kısa olduğu için ikinci mayoz çok hızlı gerçekleşir. Bu yüzden primer spermatozoidler seminifer tübüllerde en bol gözlemlenen hücrelerdir (40,45, 47).

1.7.4 Spermatidler

Spermatidler sertoli hücre girintileri (kriptaları) içinde gömülü olarak seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda bulunurlar. Sekonder spermatozoidlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşurlar ve haploid kromozom takımına sahiptirler. Spermatogenezin son aşaması spermiyogenezdir. Spermiyogenez üç evreden oluşmaktadır.

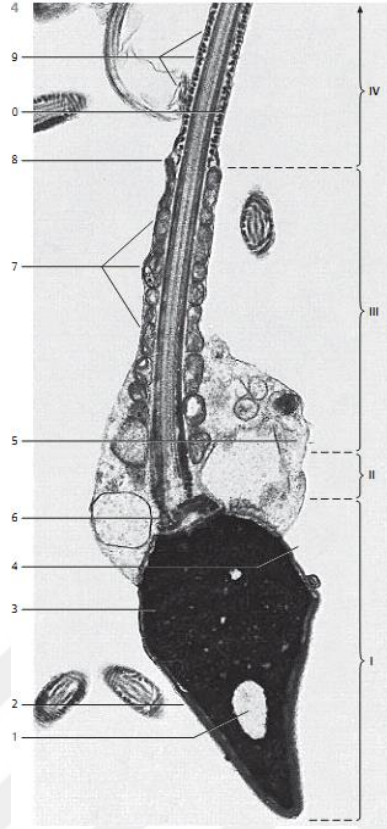
- Flagellum gelişmesi: Distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve fibröz kılıf ile çevrili aksoneme (9+2 mikrotübül çiftleri) sahiptir. Mitokondri'ler kuyruğun proksimal bölümü çevresinde sarmalimsi bir kılıf oluşturur.
- Akrozom gelişmesi: Spermin yumurtaya girerek nükleer madde aktarımı yapması için gerekli olan hidrolitik enzimlerin depolanması ve sentezinin gerçekleştiği akrozomal kese oluşur. Çekirdek koyu renkli, küçük, armut şekilli bir yapı kazanır. Akrozom gelişimi; golgi fazı, şapka fazı, akrozomal faz ve olgunlaşma fazını içerir. Akrozom yapısı içinde; hyaluronidaz, nöraminidaz, aril sülfataz, asit fosfotaz ve akrozim enzimleri bulunmaktadır.
- Nükleer kondensasyon: Histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizin'den zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma oluşur. Somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur. Nükleus materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler (40,45, 47).

1.7.5 Sperm

Olgun sperm iki elemandan oluşur: Baş ve kuyruk. Bu iki parça bir bağlantı parçası ile birbirine bağlanmıştır ve plazma membranı ile sarılmışlardır. Kuyruk orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üçe ayrılmıştır (Şekil 1-5) (48). Baş, akrozomla sarılmış yassılaştırılmış yoğun bir çekirdekten oluşur. Nükleus'un anterior yarısını akrozom örter ve lizozomlarda sıkça bulunan hidrolitik enzimleri içerir. Akrozomal enzimler, oositi saran korona radyata ve zona pellusidayı parçalayıp sperm girişini kolaylaştırmak için döllenme anında bırakılırlar.

Bağlantı parçası, bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar.

Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan kolonlardan oluşur. Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Son parça da, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (40, 46).



Şekil 1-5: Spermatozoon yapısı TEM görüntüsü (X 17000; I- Spermatozoon baş bölgesi ‘1- Nükleer vezikül, 2- Akrozom, 3- Nükleus, 4- Post-akrozomal bölge’; II- Spermatozoon boyun bölgesi ‘5- Sitoplazmik damlacık, 6-Bağlantı parçası’; III- Spermatozoon, orta parça ‘7-Mitokondriyal kılıf, 8- Annulus’; IV- Spermatozoon, ana parça ‘9-Fibröz kılıf, 10-Aksonem

1.7.6 Leydig hücreleri

Erişkin testis ağırlığının % 20’sini oluştururlar. Testosteron salgılamadığı çocukluk döneminde neredeyse hiç görülmezler (49).

Leydig hücre toplulukları, interstisyel alanda kan veya lenf damarlarına yakın olarak bulunan, yuvarlak (poligonal) şekilli, eozinofilik sitoplazmaya sahip büyük hücrelerdir (Şekil 1-6) (40). Steroid üreten birçok hücre gibi; lipid damlacıkları, karakteristik tübüller kristali mitokondriler ve iyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikulum içerir. Ayrıca lipofuksin granülleri ile reinke kristali ve prekürsörlerine sahiptir. Puberteden sonra, bir cAMP aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılmanın ardından, 5α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron'a dönüştürülebilen, testosteron üretirler (40).



Şekil 1-6: Leydig hücre yapısı TEM görüntüsü (X 10000; Ly-Lizozom, rER Granüler endoplazmik retikulum, L-Lipid, G-Golgi, M-Makrofaj).

1.7.6 Diğer Erkek İç Üreme Organları

1.7.6.1 Rete Testis

Mediastinum içine yerleşmiş, anastomozlaşan tübüler boşluklar ağıdır. Seminifer tübüllerin ürünlerini toplayan kanal yapılarından oluşur. Tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitelle döşeli, tek bir apikal silyum ve birkaç kısa mikrovillus içerirler. Nükleusları çok koyu boyanır. Sperm geçişi hızlı olduğu için lümende spermelere nadiren rastlanır (40).

1.7.6.2 Duktuli Efferentes

Efferent kanalcıklar rete testisi hareketsiz spermlerin epididimise taşınmasını sağlayan silli hücreler ve lümendeki sıvının emilimini sağlayan steriosilyalı esas hücrelerden oluşan prizmatik epitel hücrelerinden oluşur. Efferent kanalcıkların epiteli karakteristik taraklı yapıya sahiptir. Bazal lamina altında ince sirküler düz kaslar bulunur (40,45, 47).

1.7.6.3 Epididimis

İçerisinde spermlerin olgunlaştığı ve hareket yeteneği kazandığı 4-6 metre uzunluğunda kıvrımlı tüplerdir. Baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kauda) olmak üzere üç bölümden oluşur. Vas deferens ile devam eder. Kanalı saran sıkı bağ dokusu, kan damarları ve düz kas hücreleri bakımından zengindir. Epitel dallanmış steriosilyalı yalancı çok katlı prizmatiktir. Epitel esas ve bazal hücreler olarak adlandırılan iki farklı tip hücreden oluşur. Esas hücreler, çok sayıda uzun steriosilyalara sahip, uzun boylu prizmatik hücrelerdir. Bazal hücreler ise bazal lamina ile ilişkilidir ve kök hücre özelliğindedir. Sertoli hücreleri tarafından ortadan kaldırılmamış artık cisimlerin ve dejenere spermlerin fagosite edilmesi gibi olaylar burada gerçekleşir (40).

1.7.6.4 Vas Deferens

Epididim kanalının devamı şeklinde uzanan, kalın kas yapısında stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitelden oluşan bir kanaldır. Mesaneye girişte ampullayı oluşturur ve bu yapının son kısmında seminal vezikülün kanalları ile birleşir. Duktus deferens daha sonra prostata girer ve üretraya açılır. Mukoza, lümeneye doğru katlantılar yaptığı için lümen düzensiz görülür. Kas tabakası oldukça kalındır, içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyrederek (40, 46).

1.7.6.5 Vesikula Seminalis

10-15 cm uzunlukta, çok kıvrım yapan bir kanaldan oluşmuş, rektum ve mesanenin arka yüzü arasına yerleşmiş bir çift bezdir. Duvarı epitel hücreleri ile kaplıdır. Epitel hücreleri alkali karakterde seminal sıvı salgılar. Bu salgı, spermlerin

canlılıklarının korunmasını sağlar. Epiteli prizmatiktir. Meni keseciği olarak bilinmesine karşın içinde hiç sperm barındırmamaktadır (50).

1.7.6.6 Duktus Ejakulatoryus

Bir santimetre uzunluğunda, prizmatik epitelle döşeli, kısa ve düz bir kanaldır. Prostat bezine girer ve prostatik üretraya açılır. Mukoza lümenine doğru katlantılar yapar, duvarında düz kas bulunmaz (40, 46).

1.7.6.7 Prostat Bezi

Retroperitonal yerleşim gösteren bu organ, rektumun önünde, mesanenin aşağısında ve symphysis pubicanın arka tarafındadır. Koyu kırmızı kestaneye benzeyen sert bir dokudur. 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezden oluşur ve bu bezlerin kanalları prostatik üretraya boşalır. Normal bir erişkinde yaklaşık 20 gr ağırlığındadır. Prostat bezi epiteli yalancı çok katlı epiteldir ve bazal hücreler ile salgı yapan hücrelerden oluşur. Prostat bezinin salgısı, ejakülata yaklaşık % 15'ini oluşturur ve bu sıvı asit fosfataz, amilaz ve fibrinolizinden oldukça zengindir (40, 46, 51).

1.7.6.8 Bulboüretal Bezler

Prostat bezinin iki yanında testesteron kontrolü altında salgı yaparak salgısını sperm kanalı ile üretraya akıtan bezlerdir. Tek katlı prizmatik epitelle döşelidir. Salgının önemi üretrada kalan idrar artığının asitliğini ejakülasyondan önce nötralize etmesidir (40, 46).

1.8 Testis Fizyolojisi

1.8.1 Spermatogenez ve Hormonal Faktörler

Sperm yapımını kontrol eden çok sayıda parametre vardır. Luteinizan hormon (LH) hipofizden salgılanır. Leydigh hücrelerinde testesteron yapımını uyarır. Testislerde germinal hücrelerinin bölünüp gelişerek sperm oluşturulması için testesteron gereklidir.

Hipofizden salgılanan FSH (folikül stimulan hormon)'ın rolü spermatidlerin spermelere dönüşümünü sağlamaktır. FSH, sertoli hücrelerine etki ederek sertoli hücrelerinde androjeni bağlayan protein sentezini uyarır bu protein androjenle birleşip lümene salgılanır. Seminifer tübül lümeninde biriken androjen spermiogenezi sonlandırır (52).

Östrojenler FSH ile uyarılan sertoli hücrelerinde testosterondan yapılırlar ve muhtemelen spermiyogenez için gereklidirler. Büyüme hormonu ise testislerin temel metabolik fonksiyonlarının kontrolünde gereklidir. Spermatogonyumların erken bölünmesini hızlandırır (49).

1.8.2 Erkek Cinsiyet Hormonları

Testislerden; testosteron, dihidrotestosteron ve androstenedion gibi androjenler adıyla bilinerek cinsiyet hormonları salgılanmaktadır. Androjenlerin tümü steroid yapıdadır hem testislerde hem de adrenal bezlerde kolesterolden veya doğrudan asetil koenzim A'dan üretilir. Testosteron protein yıkımını azaltırken sentezini artırarak büyümeye pozitif katkı sağlar.

Testesteron karaciğerde glukorunik asit ya da sülfatlarla konjuge edilerek safra yoluyla veya idrarla atılır.

Testesteron salgılandıktan 1-2 dakika sonra hücre içine girerek 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona dönüşür. Sitoplazmik reseptör proteinine bağlanarak reseptör-hormon kompleksi oluşturur. Ardından çekirdeğe giderek bir proteine bağlanır ve DNA-RNA transkripsiyon işlemini tetikler. RNA polimeraz aktifleşerek RNA miktarı ile doğru orantılı olarak protein düzeyi yükselir (49).

1.8.3 Testislerin Hormonal Düzenlenmesi

Hipotalamusun arkuat nükleusunda bulunan nöronlardan salgılanan GnRH (Gonadotropin releasing hormone), portal kan yoluyla ön hipofize taşınarak LH ve FSH (Gonodotropinler) salgılanmasını uyarır. GnRH aralıklı olarak 1-3 saatte bir 1-2 dakika süreyle salgılanır. Ön hipofizden salgılanan LH'da pulsatil olarak, FSH ise

GnRH düzeyindeki küçük değişimlere bağlı olarak hafif artış ya da azalış gösterir (49).

Hipotalamusta GnRH bulunmadığında LH ve FSH neredeyse hiç salgılanmaz. Glikoprotein yapıda hormonlardır. Testislerde cAMP ikinci haberci sistemini aktifleyerek etki oluştururlar. Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, yalnızca LH uyarısı ile gerçekleşir. Salgılanan testosteron ve LH miktarı doğru orantılıdır (49).

LH'ın tetikleme ile salgılanan testosteron, LH salgısını baskılar. Bu olay testosteronun direk hipotalamusa etkisi sonucu GnRH salgısının azaltılmasına bağlıdır. Fakat zıt olarak, testosteronun çok az olması halinde hipotalamustan yüksek oranda GnRH salgılanır (49).

Seminifer tübüllerde FSH sertoli hücrelerine bağlanır ve hücrelerin çeşitli spermatojenik maddeleri salgılayarak büyümesine sebep olur. Bu nedenle FSH ve testosteronun her ikisinde spermatogenezin başlamasında gereklidir (49).

Seminifer tübüller sperm yapımını azalttığında FSH salgısı belirgin olarak artar. Spermatogenezin hızlanması ile FSH salgısı azalır. Bu mekanizma sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin ile kontrol edilmektedir (49).

1.9 Antioksidan Moleküller

1.9.1 Agomelatin

Melatonin triptofan aminoasidinden beyindeki pineal bezde sentezlenip salgılanan ve sirkadiyen ritmi düzenleyen önemli bir hormondur. İlk kez 1917 yılında sığır pineal bez ekstraktında Carey Pratt McCord ve Floyd Pierpont Allen tarafından farkedilmiştir. Kimyasal olarak tanımı ve izolasyonu ise 1958 yılında dermatoloji profesörü Aaron B. Lerner tarafından gerçekleştirilmiştir (116). Bu hormonun fizyolojik yararları detaylı olarak incelenmiştir. 1970'lerin sonlarında MLT'nin uyku-uyanıklık düngüsü ile ilişkili olduğu mevsim ve gündüz fotoperiodlarına ters orantılı olarak salgılandığı belirlenmiştir (117). Fakat MLT farklı etkilerle de tetiklenebilmektedir. Radioizotop çalışmaları MLT reseptörlerinin

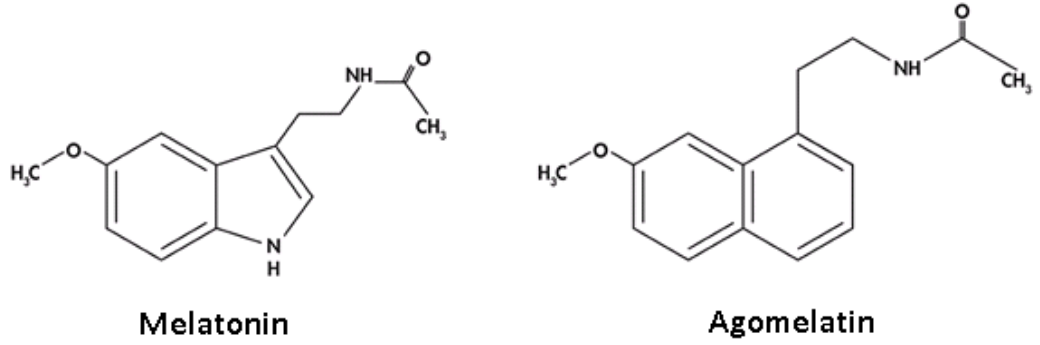
(MT1/MT2) hipotalamus ve merkezi sinir sisteminden başka kardiovasküler sistem (aort, ventrikül, koroner damarlar), sindirim sistemi (safra epiteli, duodenal enterosit), genitoüriner yollarda (Safra düz kası, ovaryum granülosa hücreleri, testiküler epitel) bulunduğunu göstermiştir (118-120). MLT'nin farmakodinamik etkisi dört mekanizma ile açıklanmaktadır;

- 1) MT reseptörlerinin etkisi
- 2) Nükleer orphan (ROR/RZS) reseptörlerinin aktivasyonu
- 3) İntrasellüler proteinlere bağlanma mekanizması (Kalmodulin)
- 4) Çok güçlü antioksidan etkisi (vitamin E'den belirgin olduğu bilinmektedir).

Mekanizmalara bakıldığında MLT'nin oksidatif stres kaynaklı olan özellikle nörodejeneratif hastalıklara karşı oldukça faydalı olacağı görülmüştür (121, 122).

MLT oldukça fazla yararlı etkiye sahip olmasına rağmen sentetik olarak fazla üretilmemektedir. Agomelatin ilk sentetik MLT analogudur. MT1/MT2 agonisti olarak antidepresan potansiyele sahiptir. Agomelatin aynı zamanda 5-HT(2C) reseptör antagonisti olarakta davranarak seratonin seviyesini düşürüp, dopamin ve nöradrenalin seviyelerini yükseltmektedir (116, 123, 124).

Agomelatin günümüzde ticari preparat olarak kullanılmaktadır (Valdoxan® 25mg, Servier). Yeni birinci sınıf sentetik melatonerjik agonisti olan bu preparat anksiyete ve majör depresif bozukluklar için kullanılmaktadır. Önerilen insan dozu günlük 25 mg tablet'tir. Nörepinephrin depamin disinhibitör (NDDI) olarak sınıflandırılmaktadır. Agomelatinin moleküler formülü $C_{15}H_{17}NO_2$ 'dir. Kimyasal formülü (S 20098; N(2-(7-metoksi-1-naftil)etil) asetamid) etil] moleküler ağırlığı 243,3'tür. Kimyasal yapısında indol grubu yerine bir naftalen bioestere grubu ve NH grubu olan yerde HC=CH grubu içermesi ile melatoninden ayrılır (125). Agomelatin ve MT'nin yapısal formülü aşağıdaki gibidir (Şekil 1-7) (126, 127).



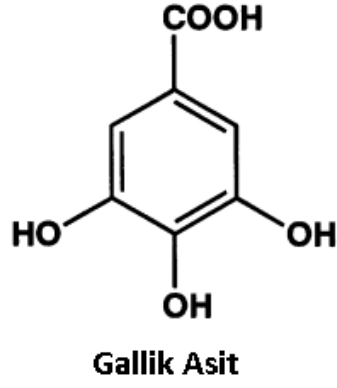
Şekil 1-7: Melatonin ve agomelatinin kimyasal yapısı.

Yapılan son çalışmalarda agomelatinin özellikle felç sonrası oksidatif dengesizliğe karşı antikonvülzan etkisi açıkça ortaya konulmuştur (128). Bu ilacın insanlarda ve deneysel modellerde epilepsiden koruyucu olarak kullanılan MT ile benzer etki gösterdiği gösterilmiştir (129, 130).

Oral olarak alınan agomelatin, gastrointestinal kanaldan hızlı olarak emilir. İlacın oral yoldan alınan 25 veya 50 mg'lik tek dozu 45-90 dakika arasında plazma tepe noktaya ulaşır. Oral biyoyararlanımı kadınlarda erkeklere göre iki kat daha yüksektir. Agomelatinin metabolitleri glukuronidasyon ile suda çözünür bileşiklere dönerek % 80'i idrarla vücuttan atılır (131).

1.9.2 Gallik Asit

Gallik asit bir organik asit olan fenolik asit türevidir. Kimyasal formülü 3,4,5-trihydroxybenzoik asit olarak bilinir (132). Moleküler formülü C₆H₂(OH)₃COOH'dir. GAL'ın yapısal formülü aşağıdaki gibidir (Şekil 1-8) (133).



Şekil 1-8: Gallik asidin kimyasal yapısı.

İlk kez 1786'da İsveçli bilim adamı Carl Wilhelm Scheele tarafından çalışmasında kullanılmıştır. 1818'de Fransız kimyager ve farmakolog Henri Braconnot tarafından Meşe cevizinden saflaştırılmıştır (134, 135).

Çay, üzüm, çilek gibi meyvelerde bolca bulunan endojen bitki fenoliğidir. GAL esterleri endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki türevli polifenolik bileşikler antidiyabetik özellikleri de içeren çok geniş farmakolojik özelliklere sahiptir. Polifenolik bileşiklerden biri olan GAL'in antioksidan ve serbest radikal toplayıcı etkisi oldukça etkilidir (136). Yapılan araştırmalarda göstermektedir ki GAL diyabetik sıçanlarda oksidatif stres parametrelerini oldukça düşürmüştür (137, 138). GAL organizmada maksimum emilim göstermektedir (139). Potansiyel reaktif oksijen süpürücüsü olan bu bileşik aynı zamanda birçok tümör hattında seçici olarak farklılaşma ve apoptoz indükleyicisidir (140). Ayrıca antiinflamatuvar, antimikrobiyal, mutasyon önleyici, etkileride bulunmaktadır (141). FDA tarafından gıdalarda en çok kullanılan antioksidan olarak belirlenmiştir (142).

Ayrıca GAL yaygın olarak ülkemiz dışında hazır çayların ve kahvelerin aromalarının artırılmasında ve şarap üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (143).

1.10 Oksidatif Stres Biyomarkerları

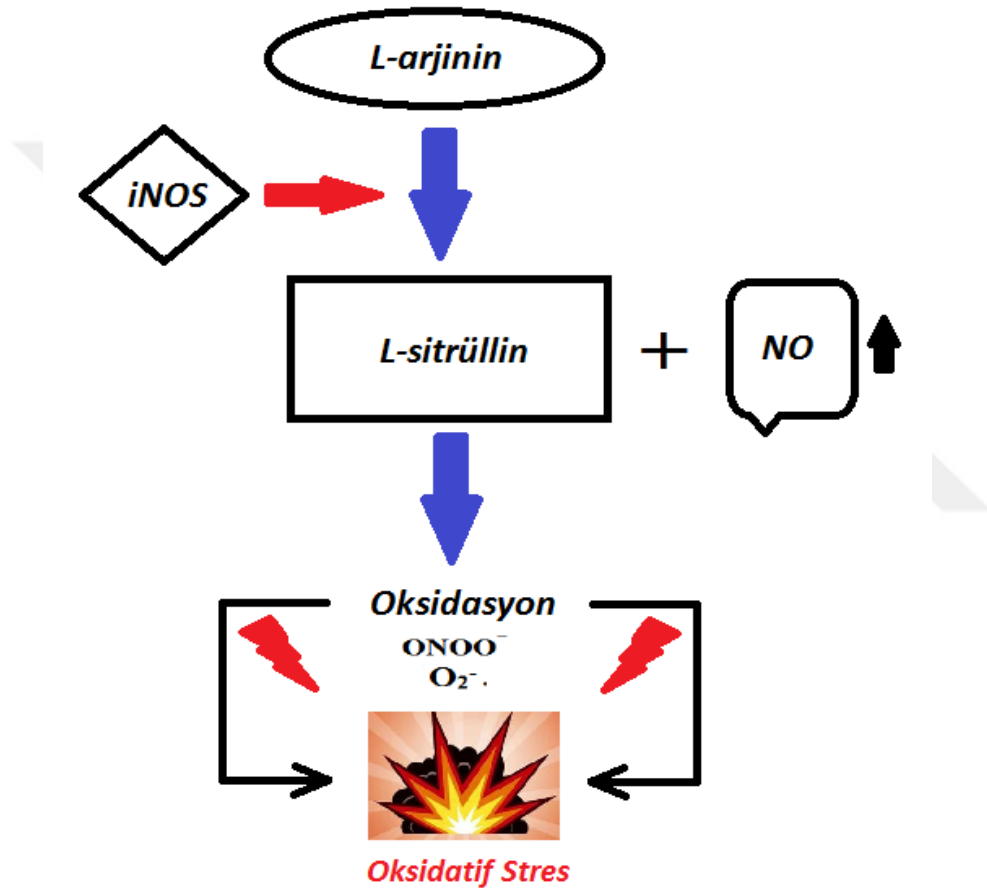
1.10.1 Nitrik Oksid ve Nitrik Oksid Sentaz

Nitrik oksid (NO), normal fizyolojik koşullarda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir moleküldür. NO serbest bir radikaldir, dolayısıyla yüksek difüzyon kabiliyetine sahiptir. Ayrıca lipofiliktir ve hücre fonksiyonlarının değişiminde bir sinyal molekülü gibi görev alabilir (144). Memeli hücrelerinde bilinen en küçük bioaktif ürünü olup, yarılanma ömrü yaklaşık beş saniyedir. NO, ilk kez endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlanmıştır. Daha sonra EDRF'nin NO olduğu anlaşılmıştır. İnsanlarda NO üretiminin saptanması ile 1987 yılına kadar hakkında fazla bilgi bulunmayan bu molekülün fizyolojik ve patolojik rolü anlaşılmıştır. 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (145). NO, biyolojik sistemlerde; düzkasları gevşetme, trombosit agregasyonunu önleme, beyinde nörotransmitter göreviyapma, makrofajların tümör yok edici ve bakteri öldürücü etkilerine aracılık yapmave vazodilatasyon etkisi ile damar basıncını düşürme gibi önemli görevler üstlenir (146). NO gibi serbest radikallerin üreme sistemi üzerindeki rolü karmaşıktır, hücresel süreçleri belli mekanizmalar olumlu ve olumsuz etkiler sağlamaktadır. NO, düşük konsantrasyonlarda vücutta yararlı etki sağlasada, yüksek konsantrasyonlarda, artan oksidanlarla birlikte, nitratlanmış ve oksitlenmiş ara ürünler oluşturmak ve birçok enzimi inhibe etmek suretiyle doku hasarı ve inflamasyona neden olmaktadır.

NO, L-arjinin aminoasitinin endotelial nitrik oksit sentaz enzimleri aracılığı ile sitruline oksitlenmesi sonucu sentezlenir. NO yapımından nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi sorumludur. NOS'un 3 farklı izoformu saptanmıştır: nöronal nitrik oksid sentaz (nNOS, NOS1) düşük miktarda üretilir sinaptik şekillenmei nörotransmisyon ve hücre iletişiminidüzenler. İndüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS, NOS2) yüksek miktarda üretilerek patojenlere immün cevap ve inflamasyonda görev alır. Endotelial nitrik oksid (eNOS, NOS3) nNOS gibi düşük miktarlarda üretilir. Vasodilatasyonu ayarlamakta görevlidir. nNOS ve eNOS izoformları Ca^{++} kalmodulin kompleksine bağımlıdır ve az miktarda NO üretirler. Buna karşılık iNOS bu kompleksten bağımsız olarak pek çok hücre tipinden salgılanır ve NO'nun devamlı sentezlenmesini indükler. İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce sürebilir. Aşırı NO sentezi dokularda harabiyete sebep olur (Tablo 1-5)

(144, 147). Yetişkin sıçan testisinde sertoli hücreleri ve peritübüler hücreler iNOS eksprese ederler. Bu enzim pakiten spermatozoid ve spermatozoidlerde yoktur. Seminifer tübül ve somatik hücrelerindeki (Leydig hücreleri ve makrofajlar) iNOS aktivitesinin birçok faktör tarafından düzenlenmekte olduğu ve Leydig hücrelerinin de iNOS ifade ettiği saptanmıştır (148).

Tablo1-5: Nitrik oksid ve oksidatif stres.



1.10.2 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), vaskülojenez ve anjiojenez düzenleyen damar geçirgenliğini arttıran endotel hücrelerine spesifik bir büyüme faktörüdür. Ayrıca retinal lökostataz ve nöron koruyucu etkileri olduğunda gösterilmiştir. Homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan bir faktörüdür.

VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer almaktadır. Senger ve ark., 1983 yılındadır da damar geçirgenliğini arttıran tümör vasküler permeabilite faktörünü (VPF) tanımlamışlardır. Ferrara ve Henzel, 1989'da endotel hücre mitojeni olarak tanımladıkları faktörü, VEGF olarak adlandırmışlardır (162, 163). Daha sonra yapılan DNA bağımlı çalışmalar ile bu iki faktörün aynı olduğu gösterilmiştir (164).

VEGF gen ailesi içinde VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plasental büyüme faktörü, VEGF-E ve VEGF-F olmak üzere 7 farklı VEGF üyesi tanımlanmıştır. Temel olarak anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve damar geçirgenliğini düzenleyen bu faktörlerin tanımlanan VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri birbirlerinden farklıdır. VEGF-A anjiyogenezle en sağlamilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür. Anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerinde yoğunlaşmaktadır (165). Genellikle VEGF diye kısaca ifade edilen faktör aslında VEGF-A'dır. VEGFR1 ve VEGFR2 reseptör yolağı ile etki eder ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek VEGF üyesidir.

Retinada, VEGF'in ana kaynağı müller hücreleri, ganglion hücreleri ve perisitlerdir. Hipoksik ya da iskemik durumlar anjiyogenezisin başlıca aktivatörleridir. VEGF-A gen ifadesinin ana düzenleyici, hipoksinin indüklediği faktör-1'dir (HIF-1) (166, 167). VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör- α (TNF α), transforming büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve interlökin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Ayrıca hipofiz hormonları da düzenlemeye yardımcıdır. Bu faktörlerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (168).

1.10.3 Fibronektin

Fibronektin yüksek moleküler ağırlığa (440 kDa) sahip bir hücre dışı matriks glikoproteinidir. İntegrinlere bağlanarak hücrelerin bazal membrana çapalamasını sağlamaktadır. Fibronektin integrine benzer şekilde diğer hücre dışı matriks komponentleri olan kollajen, fibrin ve heparan sülfat proteoglikanlarına tutunmaktadır. Fibronektin disülfid bağları ile birleşmiş olan iki identik monomerden

oluşmaktadır. Tek bir gen tarafından üretilir. Alternatif splicing farklı formlarının oluşmasını sağlamaktadır. Omurgalılarda iki tip fibronektin vardır;

- Çözülebilir plazma proteini kanın ana komponentidir ve karaciğerdeki hepatositler tarafından üretilir.
- Çözünmeyen hücre fibronektini hücre dışı matrisin temel komponentidir ve başta fibroblast olmak üzere birçok hücre tarafından üretilir.

Fibronektin hücre adezyonu, büyüme, göç ve farklılaşmada temel roller oynar. Yara iyileşmesi ve embriyonik dönemde kilit öneme sahiptir. Fibronektin ifadesi, yapımı ve organizasyonu kanser ve fibrozis gibi birçok patoloji ile ilişkilidir (169).

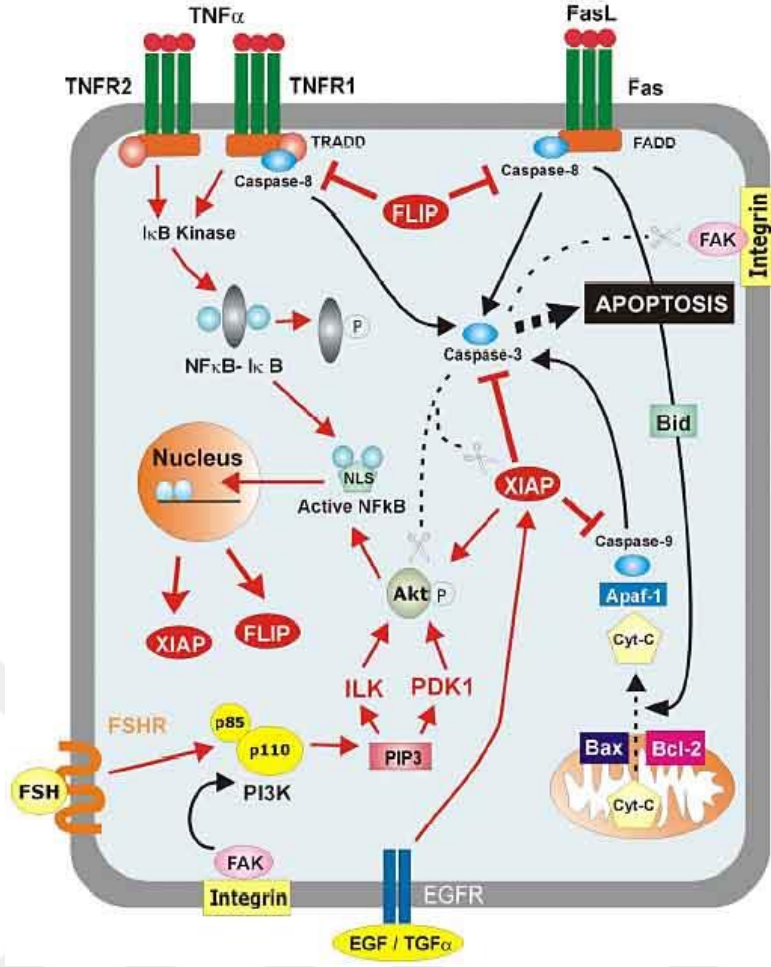
Tümör dokusu ve tümör hücre hatlarından fibronektin ifadesinde azalma, artan fibronektin degradasyonu, fibronektin bağlanma reseptörlerinin ifadesinde azalma gibi morfolojik değişiklikler görülmektedir (170).

1.10.4 Tümör Nekroz Faktör (TNF α)

Tümör nekrozu faktörü (TNF), birçok hücre tipinden salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir. Hücrelerin yaşamlarını sürdürmesi, apoptoz, inflamatuvar cevap ve hücre farklılaşması için sinyal yollarını aktive eden proinflamatuvar bir sitokindir. Glikoprotein yapıdaki bu hormon yaklaşık 212 amino asit uzunluğunda homotrimerik tip iki transmembran proteinidir. Bazı hücreler daha uzun veya daha kısa izoformlarını salgılayabilir. İnsanlarda 7. kromozomda kodlanır. TNF α (kaşektin/kaşeksin) ve TNF β , lenfotoksin olmak üzere iki formu bulunmaktadır. TNF β , T hücre lenfositleri tarafından üretilmesinde rağmen TNF α , makrofajlar ve bazı hücreler tarafından üretilir. 1968 yılında Kaliforniya üniversitesinden Dr. Gale A. Granger lenfositler tarafından üretilen ve sitotoksik etki gösteren bir faktör bularak bu faktöre lenfotoksin adını verdi. O yıllarda Yale üniversitesinden Dr. Nancy H. Ruddle'da benzer bulgulara sahip çalışmalar yapmaya başladı. 1975 yılında Memorial Sloan-Kettering Kanser Merkezinde makrofajlar tarafından üretilen bu sitotoksik faktörü Tümör nekroz faktör olarak isimlendirdi.

Bağıışıklık hücrelerinin immün regülasyonunda primer rol oynamaktadır. Ayrıca apoptotik hücre ölümleri, kaşeksi, inflamasyon, tümör inhibisyonu ve sepsise yanıtta görev almaktadır. TNF üretimindeki bozukluklar alzheimer, kanser, major depresyon gibi hastalıkların göstergesidir.

TNF, TNFR1 (TNF reseptör Tip I; CD120a) ve TNFR2 (TNF reseptör Tip II; CD120b) olmak üzere iki reseptöre bağlanabilir. TNFR1 birçok dokuda ifade edilirken TNFR2 yalnızca immün hücrelerde bulunabilir. TNF sinyali çoğunluklu olarak TNFR1'den türevlenilen TNFR2 sinyalizasyona katkısı azdır (171-174). TNF α , kaspaz, AP-1 ve NF-kB gibi üç farklı sinyal yolağını yönetmektedir. TNF α apoptotik etki mekanizması řu şekilde özetlenebilir. TNF α aktive olduktan sonra TNFR1 reseptör trimerizasyonu gerçekleşir. Trimerizasyon sonrası TNFR-ilişikili ölüm domainini (TRADD) agrege olarak işlevsel hale geçer. TRADD, FADD (Fas-İlişikili ölüm domaini), RAIDD (RIP-İlişikili ICH-1/CED-3-Homolog Ölüm Domaini), MADD (MAPK Aktive Ölüm Domaini) ve RIP'1 (Reseptör Etkileyici Protein) işlevsel kılar. Kaspaz 8 aktivasyonu ile BID kompleks aktive olarak mitokondri membranında delikler açar. Mitokondri hasarı sonucu sitokrom C serbest kalır. Sitoplazmaya sitokrom C salınımı ile kaspaz 9 aktive olur ve kaspaz 3'ü keser. Hücre ölüme sürüklenir (Şekil 1-9) (175-177).



Şekil 1-9: TNFα ilişkili sinyal yolları.

1.11 Apoptozis

Apoptoz terimi ilk olarak 1972’de J.F.K.Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen hücre ölümü şeklinde tanımlanmıştır (149, 150). Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak taç yaprakların ağaçtan, doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Günümüzde apoptoz en olgun anlamı ile programlı hücre ölümünü ifade etmektedir. Hücre iskeletinin, DNA’nın ve yapısal proteinlerin parçalanması için bazı enzimlerin aktif hale geçmesini tetikleyen bir süreçtir. Bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin organizmanın oluşumu, yaşamını sürdürmesi ve yaşlanmasına dek birçok gelişim basamağında organizmada homeostazisin devamını

sağlayan bir işlemdir. Evrimsel açıdan insandan nematoda kadar tüm canlılarda korunmuş bir hücre ölüm mekanizmasıdır (151).

Homeostazisin korunmasında embriyonik dönemde organ şekillenmesinden (Wolf veya Müller kanallarının körelmesi v.b.), doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçimine, DNA'sı ağır hasarlı veya virüsle enfekte hücrelerin ölümünün sağlanmasına kadar kilit roller oynamaktadır. Hızla bozulan zar geçirgenliğinin sebep olduğu hücrenin şişmesi ve zarın patlayarak hücre içeriğinin dış ortama dağılmasıyla sonuçlanan nekrotik süreçten farklı olarak apoptozda zar bütünlüğü bozulmaz. (152). Apoptozisde, hücre ölümü çevreyi etkilemezken bazen dolaylı olarak çevre dokuda nekroz başlatabilir veyanekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (153). Apoptozis sinyali alan bir hücrenin kromatini ve benzer şekilde sitoplazması yoğunlaşır. Hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapılar ortaya çıkarır ve bu sinyali alan hücreler tarafından fagosite edilir (154).

Apoptozisin bir dokuda normalden az veya yetersiz oluşması ile başta kanser tipleri olmak üzere nörodejeneratif, otoimmün hastalık meydana gelebilmektedir (155).

1.11.1 Apoptozis ve Proteolitik Kaskadlar

Apoptozdan sorumlu intrasellüler mekanizmanın tüm hayvanlarda benzer olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizma aktif bölgesinde sisteinbarındıran ve hedef proteinlerini aspartik asit rezidülerinden kesen proteaz ailesine bağlıdır. Bu enzimler kaspaz olarak adlandırılmaktadır (Sistein Aspartat Spesifik Protein: CASPASE). Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmıştır (156). Kaspaz bir defa aktif olduğunda diğer prokaspazları aspartik asitlerinden keserek aktive eder ve proteolitik kaskadı başlatır. Aktive olan kaspazlardan bazıları hücredeki diğer anahtar proteinleri keser. Nükleer laminler kesilerek geri dönüşümsüz lamin yıkımı oluşturulur. Normal fizyolojik koşullarda inaktif olan DNAaz'ları aktif hale getirerek çekirdek içindeki DNA'nın parçalanmasına sebep olur. Hücre hızlı bir şekilde parçalara ayrılarak diğer hücreler tarafından sindirilir. Kaspazlar üç tiptir.

- 1) Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10),
- 2) Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7),
- 3) İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

İntrasellüler hücre ölüm yolağının aktivasyonu hücrenin yeni bir hücre döngüsüne girmesine benzetilmektedir. Proteaz kaskadı yalnızca hücreyi tahrip etmez aynı zamanda kendinide aktive eder fakat geri dönüşümsüzdür (157).

Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formlarına bağlıdır. Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik üyeler olmak üzere birbirine zıt iki gruptan oluşur. Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza yüksek eğilimli, antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir (158). Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitozolde yer alır ve apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler de mitokondriyon dış membranında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında yer alırlar. Hücredeki Ca^{++} oranını kontrol ederler (157, 158).

P53 hücrede DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL baskılanarak apoptoz indüklenir (159).

Fas ligantı; 24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir. Bu şekilde; prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Fas ve TNF α dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (160).

1.11.2 Apoptozun Mekanizması

Apoptoz iki yolla gerçekleşmektedir.

- 1) İntrinsik (mitokondriyal) yol
- 2) Ekstrinsik yol
 - a- Direkt mekanizma
 - b- Dolaylı mekanizma

DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksi apoptozu tetikleyen hücre içi sinyallerden bazılarıdır. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FAS ligand aracılı apoptoz, TNF aracılı apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (İskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev almaktadır. Hücre içi sinyaller intrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indükler (161).

1.11.2.1 İntrinsik Yol

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden biri olan antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por açarak zar potansiyelini değiştirir (160). Mitokondriyal membranlardan porlardan sitokrom-C, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımı gerçekleşir. Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamda bulunması ise kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonunu engeller. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-C, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz 9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz 9 da prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3 haline getirir. Aktif kaspaz 3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive

edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (158).

1.11.2.2 Ekstrinsik Yol

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF α , TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu yapıyı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen kompleksi oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz 8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz 8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz 8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yolla kaspaz 3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz 8 kaspaz 3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz 9'u aktive ettikten sonra kaspaz 3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olan kaspaz 3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur (158).

Ekstrinsik yollardan biriside sfingolipid yoludur. Radyasyon, kemoterapi, ölüm reseptörleri ile aktive olan sfingomyelinaz, sfingomyelini seramid'e dönüştürür. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüşür. Sfingozin de Bid yapımını artırarak apoptozu tetikler (45, 47).

1.12 AMAÇ

Bizde yaptığımız çalışmada; STZ aracılı diyabet oluşturulan erkek sıçanlarda testis dokusundaki histolojik değişikliklerin ve bu değişiklikler üzerine Gallik asit ve Agomelatinin olası tedavi edici etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılmasını amaçlamaktayız.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Deneysel Yöntem

Deneysel çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 26 Mart 2014 tarih, 2014-026 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir. Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, ağırlıkları 190-220 gr arasında değişen, seksüel olgunluğa ulaşmış *Rattus albinus* erkek sıçanları temin edilerek Ege Üniversitesi, Argefar, Faz Öncesi Araştırma Biriminde 25°C oda ısısında, 12 saat aydınlık ve karanlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak araştırmaya alındılar. Yem ve su günlük olarak değiştirildi. Çalışma süresince hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan bağımsız havalandırma sistemlerine sahip deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde tutuldu.

2.2 Deney Grupları

Sıçanlar, vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra rastgele seçilip dört gruba ayrıldı (Şekil 2-1):

Grup 1: Kontrol grubu (K; n=7). Erkek sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

Grup 2: Diyabet grubu (DM; n=7) STZ enjeksiyonundan (55 mg/kg, tek doz) 1 hafta sonra, 3 hafta boyunca gavaj yardımı ile % 0,9 NaCl izotonikle beslenmiştir.

Grup 3: Agomelatin grubu (AGO; n=7) STZ enjeksiyonundan (55 mg/kg, tek doz) 1 hafta sonra, 3 hafta boyunca gavaj yardımı ile 20 mg/kg agomelatin ile beslenmiştir.

Grup 4: Gallik asit grubu (GAL; n=7) STZ enjeksiyonundan (55 mg/kg, tek doz) 1 hafta sonra, 3 hafta boyunca gavaj yardımı ile 20 mg/kg gallik asit ile beslenmiştir.



Şekil 2-1: Hayvanların gruplandırılması.

2.3 STZ Uygulaması ve Testislerin Alınması

Deney öncesinde sıçanların kan glikoz seviyeleri, kuyruk venlerinden el glukometresi (Accu Chek Glukometre-Roche) ile yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Diyabet oluşturulacak sıçanlar için 450 mg Streptozotosin (STZ) (Sigma, USA), 10 ml 0,1 M sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde çözülüp (55 mg/kg, tek doz), hayvan ağırlıklarına göre, intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı (şekil 2-2). DM, AGO ve GAL gruplarına ait sıçanlardan STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra tekrar kan alınıp, glukometreyle kan glikoz seviyeleri ölçüldü. Kan glikoz seviyeleri 250 mg/dL ve üzerinde olanlar diyabet kabul edilerek çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu dışındaki hayvanlara STZ enjeksiyonundan 1 hafta sonra gavaj uygulanmaya başlandı. DM grubu sıçanlara % 0,9 NaCl izotonik, AGO grubu sıçanlara 20 mg/kg agomelatin % 0,9 NaCl izotonik'te çözülerek, GAL grubu sıçanlara 20 mg/kg gallik asit % 0,9 NaCl izotonik'te çözülerek hergün sabah saat 10.00'da gavaj yardımı ile (Şekil 2-3) oral yoldan verildi. Dört haftalık deney süresinde; tüm hayvanlar standart sıçan pellet yemi ve normal içme suyu ile beslendiler.



Şekil 2-2: STZ i.p. uygulaması.



Şekil 2-3: Gavaj uygulaması.

Dört haftanın sonunda tüm gruptaki hayvanlara (intramusküler olarak kombine edilmiş anestezi 10 mg/kg xylazine (Alfazyne % 2, Ege Vet, İzmir) ve 60 mg/kg ketamine hydrochloride (Alfamine % 10, Ege Vet, İzmir) uygulanmış ve sıçanların ağırlıkları tartılmıştır (Şekil 2-4). Histolojik analizler için sıçanlar dekapite edilerek sol testisler ağırlıkları belirlendikten sonra % 10 nötral tamponlu formol (Merck, USA) (24 saat) içerisinde alınmıştır (Şekil 2-5). Biyokimyasal analizler için sıçanlar dekapite edilerek sağ testislerinağırlıkları belirlendikten sonra vialler içerisinde -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 2-4: Sıçanlarda anestezi uygulama ve ağırlık tartma.



Şekil 2-5: Testislerin diseksiyonu.

2.4 Mikroskopik Analiz

2.4.1 Tespit Solüsyonları

% 10 'luk Nötral Tamponlu Formalin Tespit Solüsyonu (178)

Formaldehit	100cc
PBS	900cc

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (178)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4+2\text{H}_2\text{O}$	0,813 gr
$\text{Na}_2\text{HPO}_4+7\text{H}_2\text{O}$	4,040gr
NaCl	8,78gr
Distile su	1000cc
pH 7,2-7,4 olmalıdır.	

2.4.2 Işık Mikroskopik Yöntem

2.4.2.1 Doku Takibi ve Gömme (179)

- Parçalar % 10 formalin çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle bekletilerek fikse edildi.
- 24 saat PBS tamponunda bekletilerek yıkandı.
- 2 saat % 80 Etanol,
- 3 saat % 95 Etanol I,
- 3 saat % 95 Etanol II,
- 2 saat % 100 Etanol I,
- 2 saat % 100 Etanol II,
- 2 saat % 100 Etanol III'de bekletilerek dehidretasyon işlemi gerçekleştirildi.

- Ksilol ile şeffaflandırma aşamasına geçildi (Ksilol I 30 dakika, Ksilol II 30 dakika).
- Şeffaflandırma aşamasını sonrası 60°C etüvde erimiş parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletildi.
- Ertesi gün etüvden çıkarılıp erimiş mavi parafine gömülerek bloklandı.

2.4.2.2 Kesit Alma (179)

- Işık mikroskopik incelemeler için mikrotomda (Leica RM 2145) 3µ'luk kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlanarak rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine doku kesitleri alındı.
- Tüm kesitler 1 gece 37°C'lik etüvde tutularak lam üzerine yapışmaları sağlandı.
- Ksilolle parafinden uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi.
- Uygun histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar için preparatlar hazır hale getirildi.

2.4.2.3 Histokimyasal Boyamalar

2.4.2.3.1 Hematoksilen Eosin (H.E.) Boyama (180)

- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Ksilol III 10 dakika
- Kuruduktan sonra alkole geçirildi.
- % 100 Alkol I 2 dakika
- % 100 Alkol II 2 dakika
- % 95 Alkol 2 dakika
- %80 Alkol 2 dakika
- Distile su 5 dakika
- Hematoksilen 2,5 dakika

- Akarsu 5 dakika
- Asit alkol (Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarılır.)
- Akarsu
- Amonyaklı su (Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akarsu
- Distile su 5 dakika
- Eosin 2,5 dakika
- % 95 Alkol 2 dakika
- % 100 Alkol I 2 dakika
- % 100 Alkol II 2 dakika
- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Ksilol III 10 dakika
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.

Sonuçlar: Nükleus: Mavi, Sitoplazma: Pembe

2.4.2.3.2 Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama (181)

PAS Boyama Solüsyonları:

A.	Peryodik asit solüsyon	30 ml
B.	Schiff ayıracı	30 ml
C.	Potasyum methabisülfite solüsyon	30 ml
D.	Fiksatif solüsyon	30 ml
E.	Mayer's hematoksilen	30 ml

PAS Boyama:

- Ksilol
- Distile su ile yıkama
- 10 damla A solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika beklendi.
- Distile su ile yıkama
- 10 damla B solüsyonu damlatıldı ve 20 dakika beklendi.
- Distile su ile yıkama
- 10 damla C solüsyonu damlatıldı ve 2 dakika beklendi.
- Preparatlar kurutuldu.
- 10 damla D solüsyonu damlatıldı ve 2 dakika beklendi.
- 10 damla E solüsyonu damlatıldı ve 3 dakika beklendi.
- Çeşme suyunda 5 dakika yıkama
- % 80 Alkol 1 dakika
- % 95 Alkol 1 dakika
- % 100 Alkol 1 dakika
- 10 dakika ksilolde bekleme
- Entellan ile preparatlar kapatıldı.

Sonuçlar: Nükleus: Mavi. Glikojen ve diğer PAS pozitif reaksiyon veren alanlar: Kırmızıdan mora değişen renklere saptanır.

2.4.2.3.3 İmmunohistokimyasal Boyama (182)

- Kesitler, bir gece 60°C etüvde ve soğuduktan sonra 3x30 dakika ksilolde tutuldu.
- Sırasıyla %95, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde 2'şer dk bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dk yıkandı ve çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildi.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.

- Kullanılacak antikor için önerilen “antijen retrieval” yöntemi uygulandı.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Endojen peroksit blokajı yapıldı.(% 3 H₂O₂) (5 dakika).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandıktan sonra kesitler üzerine Blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenildi.
- Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda bir gece 4°C’de bekletildi (Primer antikor dilüsyonları: Fibronektin: 1/250; NOS2’: 1/100; VEGF:1/100; TNFα: 1/100) (Bioss, USA).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. DAB (3,3-diaminobenzidine) solüsyonu damlatılır, 10 dk kapalı nemli kutuda bekletildi ve tekrar PBS solüsyonu ile 3x5 dk ve distile su ile yıkandı.
- Mayers’in hematoksilin ile Nükleus boyanması kontrol edilerek 5 dk boyama yapıldı.
- Distile su ile yıkandı.
- Sırasıyla % 80, % 95 ve % 100’lük etil alkolde 1’er dk bekletildi.
- Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5’er dk ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kapama mediumuyla lamel ile kesitler kapatıldı.

2.4.2.3.4 Tunel Boyama

- Kesitler 1 gün önceden deparafinizasyon için Ksilole yerleştirilir.
- % 100 alkol
- % 95 alkol

- % 80 alkol
- % 1 Triton X-100'lü PBS ile yıkama (pH:7,4)
- Dokuların etrafı sınırlayıcı kalem ile çizilir
- Proteinaz K eklenir (3,9 µl proteinaz K + 35 µl distile su)
- Lamların üzeri cover slip ile kapatılarak 15 dakika beklenir
- PBS ile yıkama 2 kez 5'er dakika
- H₂O₂ ile yıkama (63 ml PBS + 7ml H₂O₂) 5 dakika
- PBS ile yıkama 3 kez 1 er dakika
- Equilibration tamponu 5 dakika
- Equilibration tamponu lamlardan uzaklaştırılır
- TdT enzimi eklenir (77 µl Reaksiyon tamponu + 33 µl TdT enzimi)
- Lamların üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C etüve konulur.
- Stop/Wash tampon ile yıkama (2 ml stop/wash tamponu + 68 ml distile su) 10 dakika
- PBS ile yıkama 4 kez 2 şer dakika
- Anti-Dioksigenin peroksidaz eklenir (Lamların üzeri kapatılır, 30 dakika nemli oda sıcaklığında beklenir).
- PBS ile yıkama 4 kez 2 şer dakika
- DAB eklenir (735 µl DAB Dilution buffer + 15 µl DAB substrat)
- Distile su ile yıkama 3 dakika
- % 0,5 Metil green eklenir 10 dakika
- Distile su ile yıkama 3 dakika
- % 100 N-Butanol ile yıkama
- % 80 alkol
- % 95 alkol
- % 100 alkol
- Ksilen I

- Ksilen II
- Ksilen III
- Entalen ile preparatlar kapatılır.

(Millipore, Apoptag, Germany)

2.4.3 Johnsen Testiküler Skoru

Hematoksilen eozin ile boyanmış testis preparatlarında, her gruptan rastgele 10 adet testis dokusu preparatı incelenmiş, her grup için ayrı ayrı 100 adet tübül değerlendirilerek ortalama Johnsen testiküler biyopsi skoru (Tablo 2-1) hesaplanmıştır. Deney grupları için hesaplanan ortalamalar arasındaki değişkenlikler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı (SPSS/PC-16, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). p değeri 0,05'ten küçük olan gruplar arasındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (183).

Tablo 2-1: Johnsen testiküler biyopsi skoru.

Skor	Histolojik Bulgular
10	Komplete spermatogenez, çok sayıda spermatozoa, düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı tubular lümen.
9	Çok sayıda spermatozoa, disorganize germinal epitel oblitere tubular lümen.
8	Tubular kesit başına 5±10'dan daha az spermatozoa.
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatogonia.
6	Spermatozoa yok, 5±20 spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia.
5	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia.
4	Spermatozoa ve spermatid yok, spermatosit 5'den az, fakat çok sayıda spermatogonia.
3	Sadece spermatogonia.
2	Germinal hücreler yok, sadece sertoli hücreleri var (Sertoli-cell-only sendromu).
1	Tübüler hiç hücre yok.

2.4.4 Testis Seminifer Tübül Çaplarının Ölçümü

Hematoksilen eozin ile boyanmış testis preparatlarında, her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 tübül incelenmiştir. Image-Pro Express 4.5 programı kullanılarak ölçülmüş ve ortalama skor hesaplanmıştır.

2.4.5 Bazal Lamina Kalınlık Ölçümü

PAS ile boyanmış testis preparatlarında, her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 tübül incelenmiştir. Image-Pro Express 4.5 programı kullanılarak ölçülmüş ve ortalama skor hesaplanmıştır.

2.5 Biyokimyasal Analizler

2.5.1 SOD Aktivitesinin Belirlenmesi

Total SOD aktivitesi Sun ve ark. nın (184) metodu ile testis dokusundan elde edilmiştir. Metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Süperoksit dismutaz enzimi, toksik süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü sağlamaktadır. Süperoksit dismutaz enzim aktivite ölçümünde ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür (INT) ile tepkimeye giren ve kırmızı renkli formazon boyası oluşturan süperoksit radikalleri üretilmektedir. Enzim aktivite ölçümü ise ortamda bulunan SOD enziminin inhibe edebildiği süperoksit radikalleri ile gösterilir. 505 nm'de ölçülür, Reaksiyon çözeltileri Tablo 2-2 'deki gibidir. Bir ünite SOD, NBT redüksiyon oranında % 50 inhibisyon sağlayan enzim miktarına eşittir. SOD aktivitesi ünite/mg doku proteini olarak ifade edilmiştir. Örnekler 5 paralelli olarak analiz edilmiştir.

Tablo 2-2: SOD aktivite ölçümü için kullanılan çözeltiler.

Küvet içeriği (µL)	Örnek	Kör
Fosfat tamponu	1525	1650
Ksantin oksidaz	250	250
Ksantin	500	500
INT	600	600
Testis Hemolizati	125	-

2.5.2 Testis Lipid Peroksidasyon Ölçümü (MDA)

Lipid peroksidaz testis dokusundan thiobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARS) ile malondialdahit (MDA) seviyesinin ölçümü ile belirlenmiştir. Trikloroasetik asit ve TBARS reaktifi testis dokusuna eklenerek karıştırılarak 100 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Örnek buz üzerinde soğutulduktan sonra 20 dakika 3000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant absorbansı 535 nm’de okunmuştur. MDA seviyeleri tetraethoxypropane standart kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır (nmol/gr protein) (185). Örnekler 5 paralelli olarak analiz edilmiştir.

2.5.3 Katalaz Aktivite Ölçümü (KAT)

Katalaz hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene ayrılmasını katalizlemektedir. Katalaz aktivitesi Abei’nin kullandığı metoda göre uygulanmıştır (186). Hidrojen peroksitin azalması 240 nm’de (Thermo, Varioskan, USA) izlenmektedir. Her ünite zamandaki absorbans farkı katalaz aktivitesini vermektedir. Örnekler 500 µL lizat ve 500 µL substrat solüsyonu (50 mM phosphate buffer içerisinde 10 mM H₂O₂, pH 7,0) kör ise 1 ml fosfat tamponundan oluşmaktadır. Reaksiyon substrat solüsyonu eklenerek başlatılır, 20 °C yaklaşık 1 dakika inkübe edilir. Katalaz aktivitesi mmol H₂O₂ /dk/mg protein olarak ifade edilir. Bir ünite enzim 20 °C’de 1 dakikada 1 µmol H₂O₂ açığa çıkaran enzim miktarına eşittir. Spesifik aktivite mg protein başına ünite olarak hesaplanır. Örnekler 5 paralelli olarak analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

STZ ile indüklenmiş deneysel diyabet çalışmamızdaki sıçanların STZ enjeksiyonu öncesi ve sonrası; vücut-testis ağırlıkları ve kan şekeri düzeylerinin ortalaması Tablo 3-1’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ($p=0,000$) hayvanların deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında tek yönlü varyans analizlerine göre (ANOVA) anlamlı artış saptanmıştır. Diyabet ($p=0,012$) grubu hayvanlarda deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında anlamlı bir azalma gözlenirken, AGO ($p=0,475$) ve GAL ($p=0,256$) gruplarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Diyabet grubu hayvanların testis ağırlıklarına bakıldığında kontrole göre diyabet grubunda anlamlı azalma görülmektedir ($p=0,000$). Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında AGO ($p=0,01$) grubundaki testis ağırlıklarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. GAL ($p=0,26$) grubunda ise anlamlı artış gözlenememiştir (* $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmektedir).

Tablo 3-1: Kontrol grubu sıçanların STZ enjeksiyonu öncesi ve sonrası; vücut-testis ağırlıkları ve kan şekeri düzeylerinin ortalamaları.

Gruplar	Vücut Ağırlığı (gr)		Şeker Düzeyi (mg/dl)		Testis ağırlığı (gr)	
	Başlangıç	Bitiş	Başlangıç	Bitiş	Sol	Sağ
DM	214,71±5,34	185,42±10,10	456±43,10	321±32,11	1,23±0,03	1,27±0,02
Kontrol	222,42±5,08	261,14±7,94	130±5,77	200,42±9,76	1,38±0,02	1,42±0,04
AGO	202,28±4,34	201,85±5,32	401,14±31,28	382,14±49,87	1,32±0,03	1,35±0,04
GAL	203,57±5,68	197,85±6,26	477,28±42,44	368,85±42,30	1,31±0,02	1,30±0,01

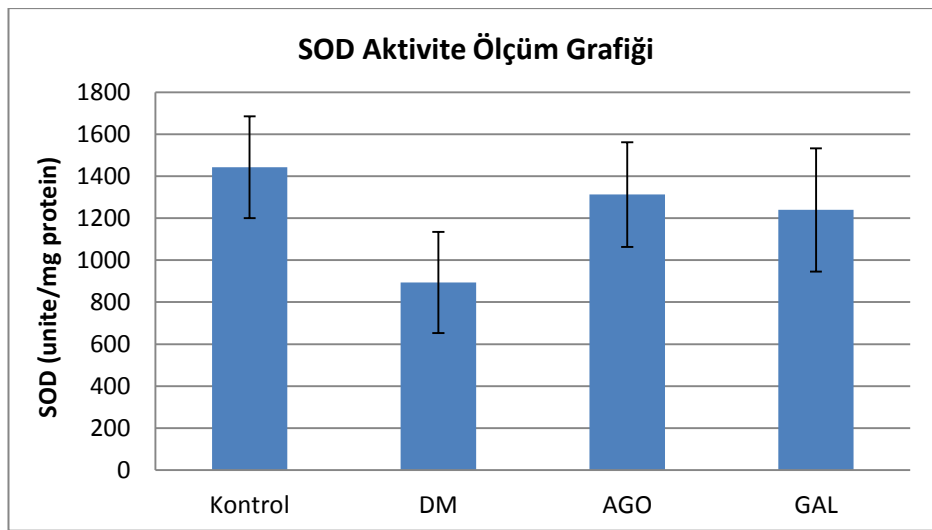
3.1 Biyokimyasal Bulgular

3.1.1 SOD Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD aktivite ölçümü istatistiksel değerleri Tablo 3-2' de aktivite ölçüm grafiği Şekil 3-1' de p değerleri ise Tablo 3-5' te verilmiştir.

Tablo 3-2: SOD Aktivite ölçüm ve istatistiksel değer tablosu.

SOD Aktivite Ölçüm ve İstatistiksel Değer Tablosu (Ünite/mg protein)				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	1710,20±1,14	865,30±1,22	1015,20±0,93	1215,25±1,05
2	1525,60±1,05	786,20±1,34	1025,35±0,89	1015,12±0,70
3	1254,30±1,00	458,50±1,23	1185,00±1,09	985,18±1,00
4	1674,30±1,23	987,10±1,00	1645,26±1,23	958,21±0,72
5	1015,20±1,11	1025,80±0,81	1546,12±1,05	1545,10±0,70
6	1478,50±0,70	1241,30±0,57	1457,50±1,05	1715,60±0,78
7	1440,90±1,20	895,10±0,73	1314,50±1,12	1240,10±1,23
Ortalama	1442,71±1,06	894,18±0,98	1312,70±1,05	1239,22±0,88



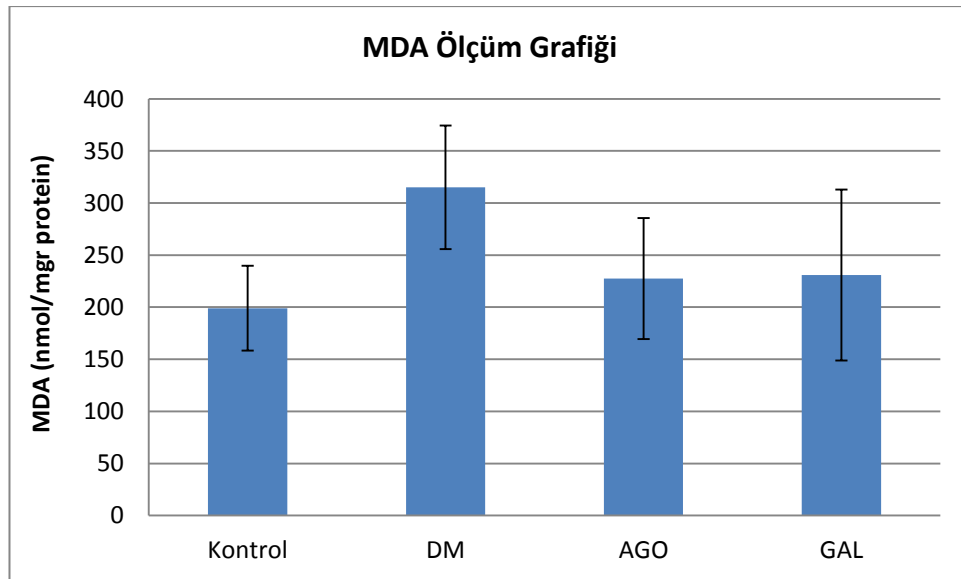
Şekil 3-1: SOD aktivite ölçüm grafiği.

3.1.2 Testis Lipid Peroksidasyon Ölçümü (MDA)

MDA miktarı ölçüm ve istatistiksel değerleri Tablo 3-3' de miktar ölçüm grafiği Şekil 3-2' de p değerleri ise Tablo 3-5' te verilmiştir.

Tablo 3-3: MDA ölçüm ve istatistiksel değer tablosu.

MDA Ölçüm ve İstatistiksel Değer Tablosu (nmol/ml)				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	185,10±2,10	325,60±2,70	125,60±1,96	325,10±1,33
2	165,00±0,02	415,30±0,45	248,30±0,23	245,60±0,05
3	143,20±0,45	215,80±0,56	258,60±1,10	305,80±1,01
4	256,60±1,01	325,10±0,12	315,60±0,66	125,78±0,40
5	198,70±0,32	322,50±0,77	205,80±0,34	115,50±0,45
6	245,30±1,10	285,60±1,60	210,60±1,12	267,50±2,10
7	199,10±0,45	315,20±1,16	228,10±0,30	231,20±1,40
Ortalama	199,00±0,77	315,01±1,05	227,51±0,81	230,92±0,96



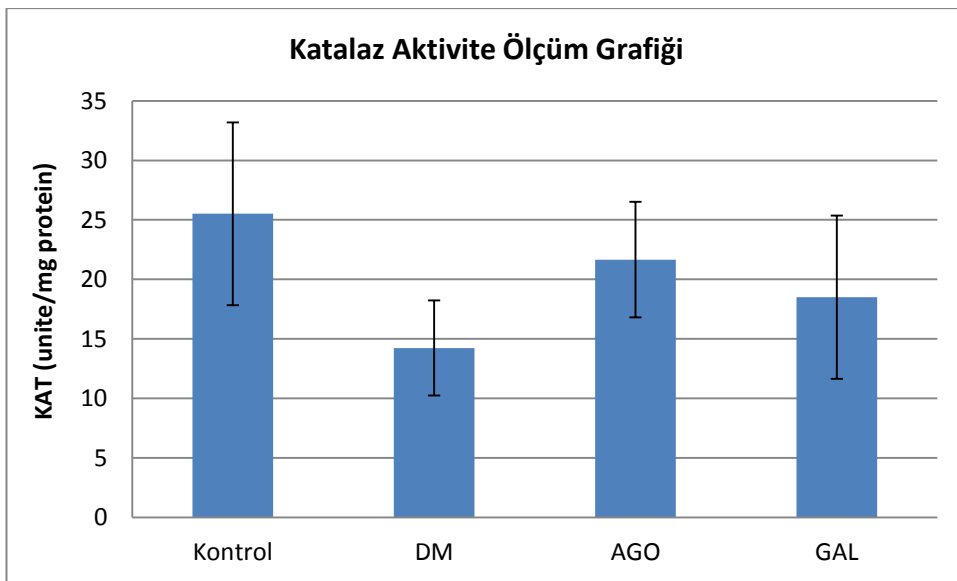
Şekil 3-2: MDA ölçüm grafiği.

3.1.3 Katalaz Aktivite Ölçümü (KAT)

SOD aktivite ölçümü istatistiksel değerleri Tablo 3-4' de aktivite ölçüm grafiği Şekil 3-3' de p değerleri ise Tablo 3-5' te verilmiştir.

Tablo 3-4: Katalaz aktivite ölçüm ve istatistiksel değer tablosu.

Katalaz Aktivite Ölçüm ve İstatistiksel Değer Tablosu (Ünite/g Hb)				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	25,21±0,10	15,60±0,03	19,80±0,71	12,10±0,14
2	35,80±0,23	21,20±0,02	25,60±0,36	16,60±0,19
3	15,30±0,34	14,30±0,52	13,50±0,75	11,30±0,31
4	21,60±0,12	8,60±0,26	23,10±0,65	28,90±0,96
5	19,80±0,34	14,70±0,42	19,70±0,71	26,70±0,23
6	35,30±0,34	10,60±0,61	28,70±0,34	15,30±0,62
7	25,60±0,57	14,70±0,89	21,22±0,73	18,60±0,63
Ortalama	25,51±0,29	14,24±0,39	21,66±0,60	18,50±0,44



Şekil 3-3: Katalaz aktivite ölçüm grafiği.

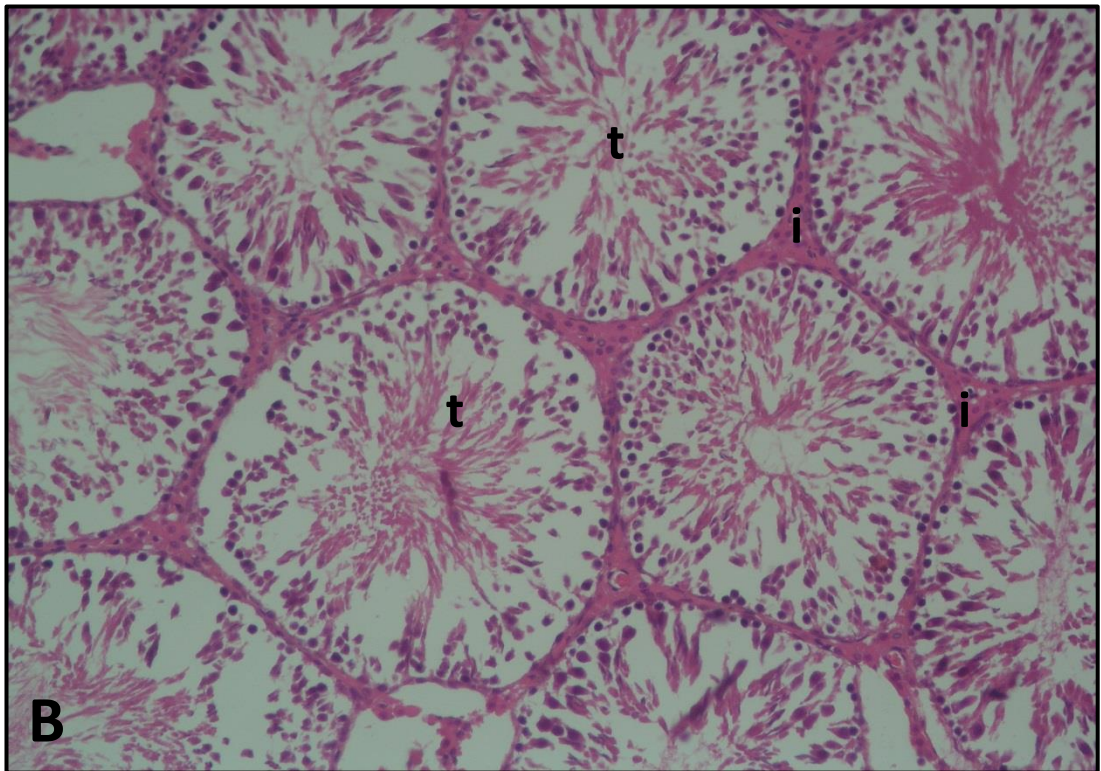
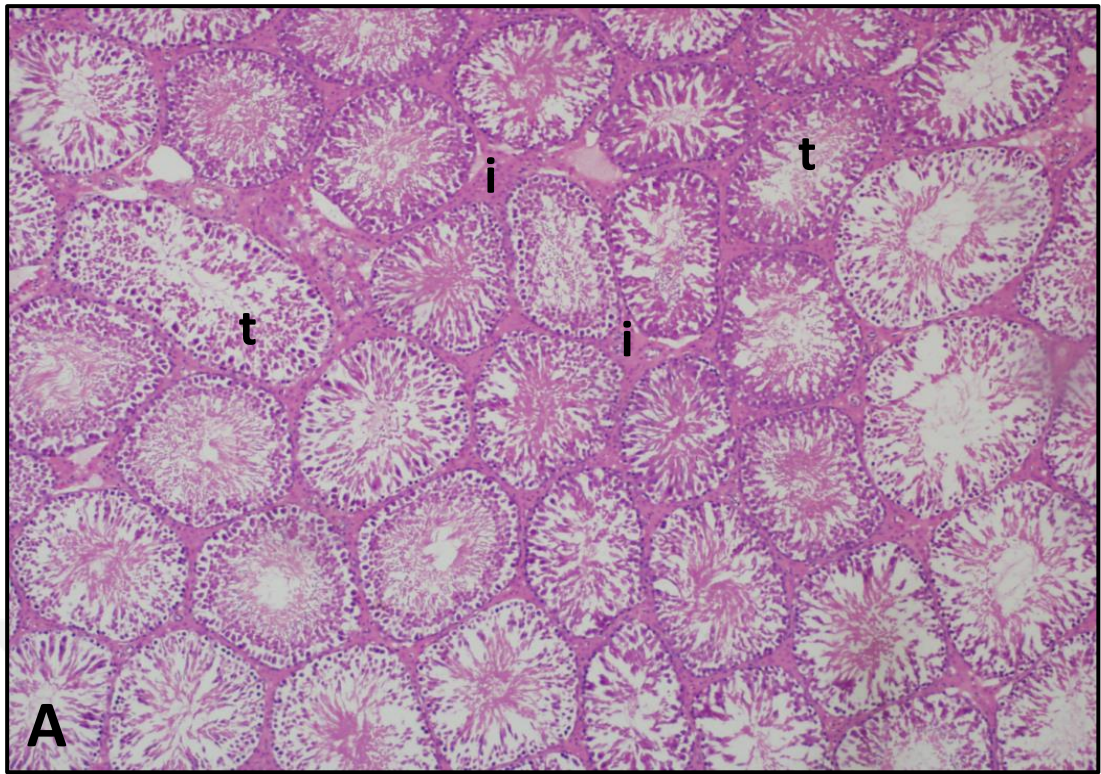
Tablo 3-5: Deney gruplarının SOD, KAT aktiviteleri MDA miktarlarına göre p değerleri dağılımı (*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir).

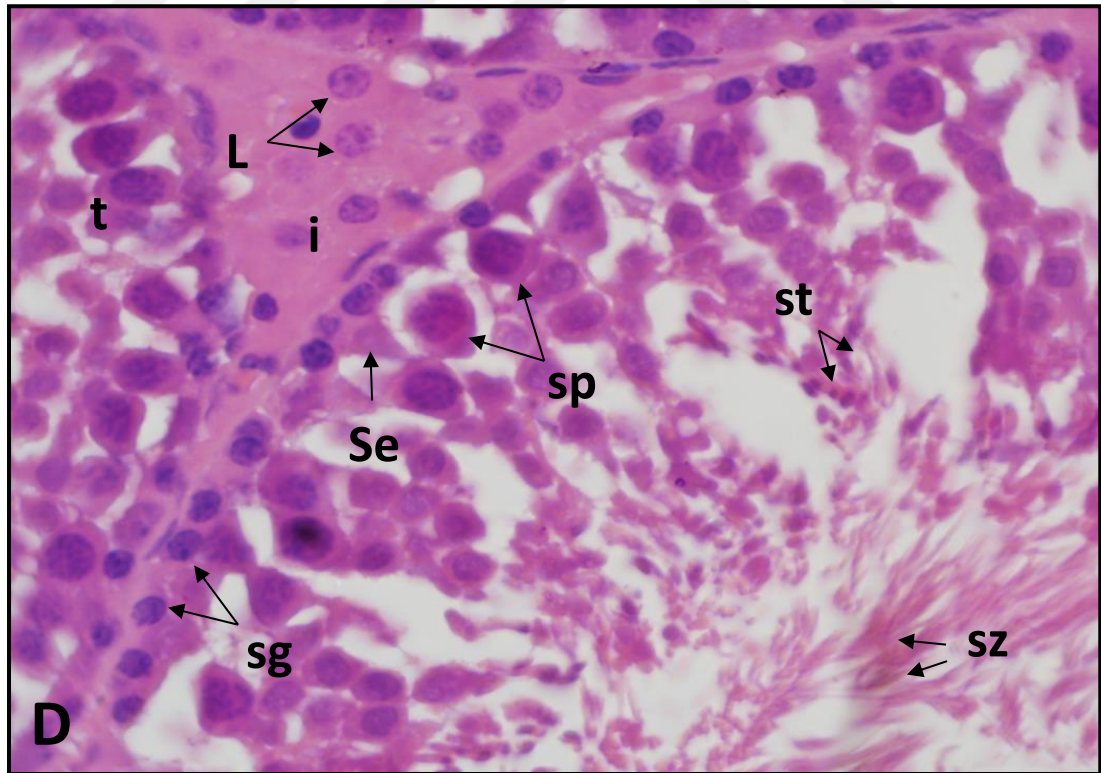
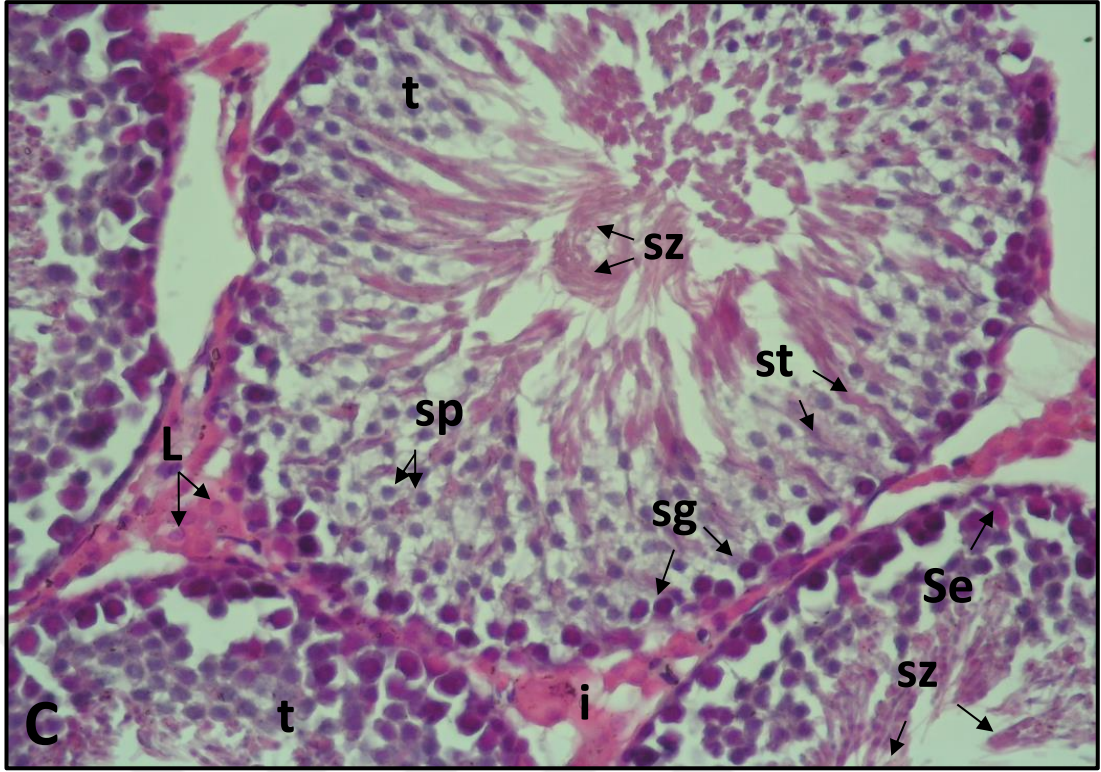
<i>Gruplar</i>	<i>SOD</i>	<i>MDA</i>	<i>KAT</i>
K-DM	0,000*	0,000*	0,002*
DM-AGO	0,003*	0,008*	0,004*
DM-GAL	0,016*	0,024*	0,090
AGO-GAL	0,311	0,464	0,169

3.2 Histolojik Bulgular

3.2.1 Hematoksilen - Eosin Boyama

H.E. ile boyanan kontrol grubuna ait testis histolojik kesitlerinde seminifer tübül sınırlarının düzgün olduğu, seminifer tübüllerde germ hücrelerinin düzenli olarak sıralandığı, sertoli hücreleri ve değişik evrelerdeki tübüllerde bulunan spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermatozoaları içeren spermatogenik seri hücrelerinin normal histolojik görünümünü korudukları gözlenmiştir. İnterstisyumun normal görünümde olduğu soluk boyalı nükleusları ile Leydig hücrelerinin, damar yapılarının, endotel hücrelerinin ve miyoepitel hücrelerinin normal histolojik yapıda oldukları izlenmiştir (Şekil 3-4).

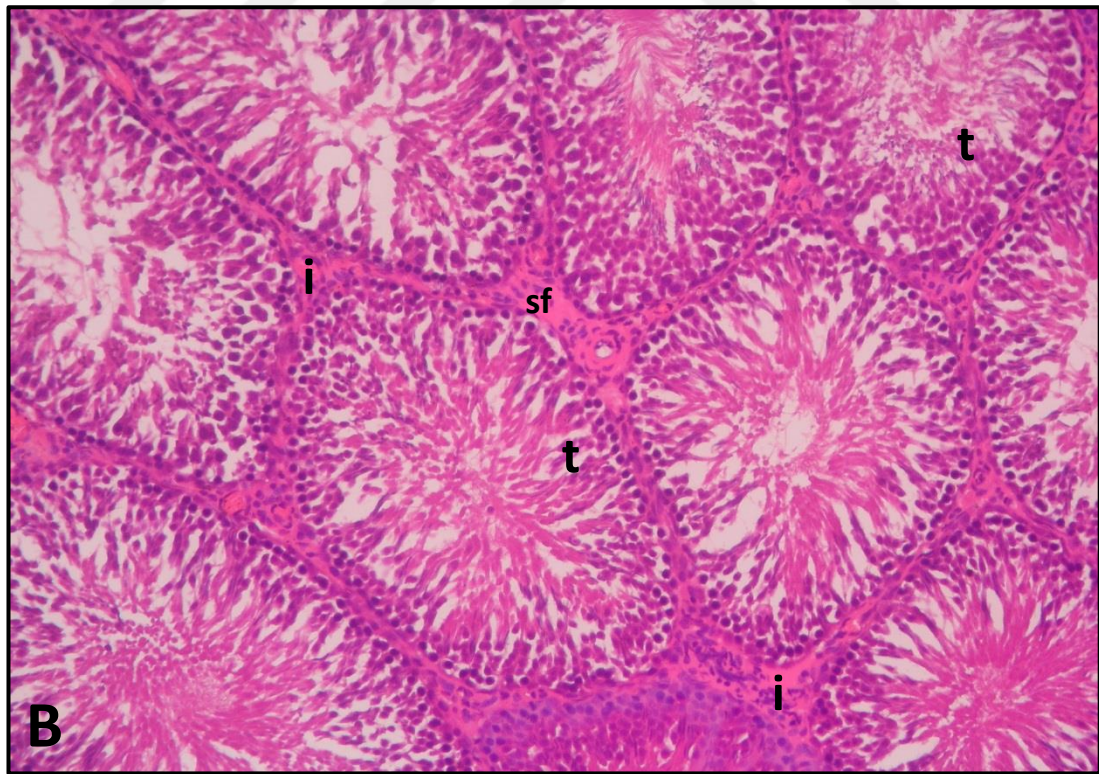


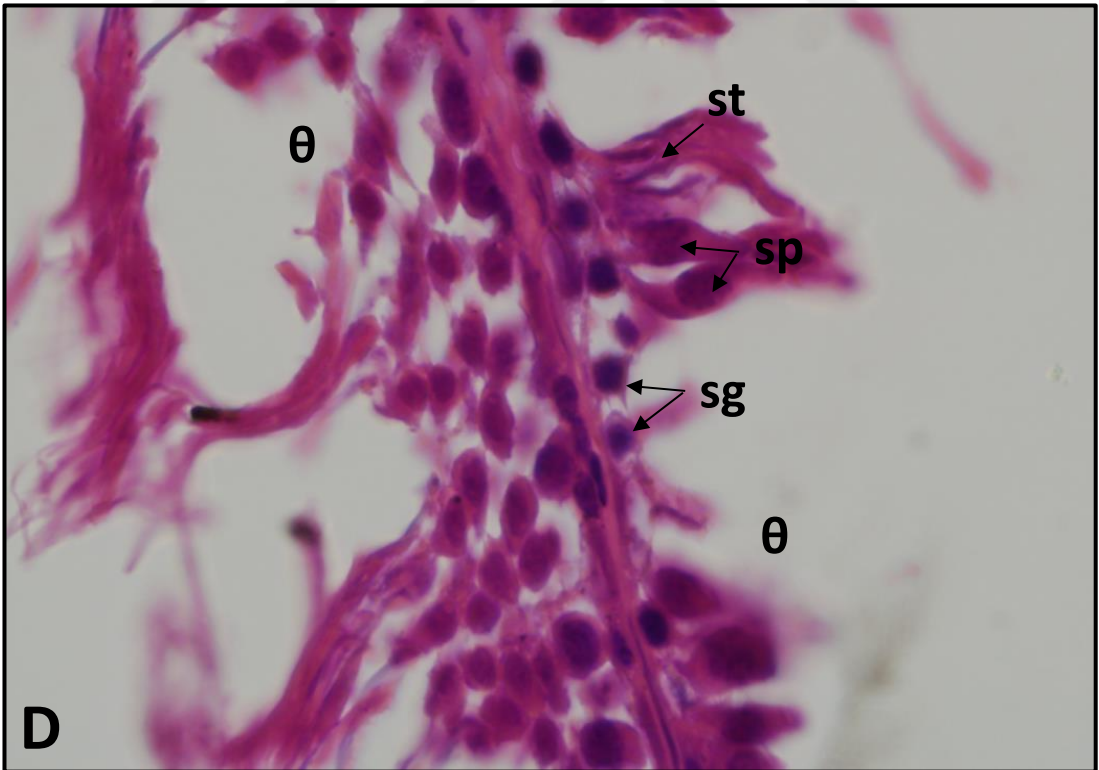
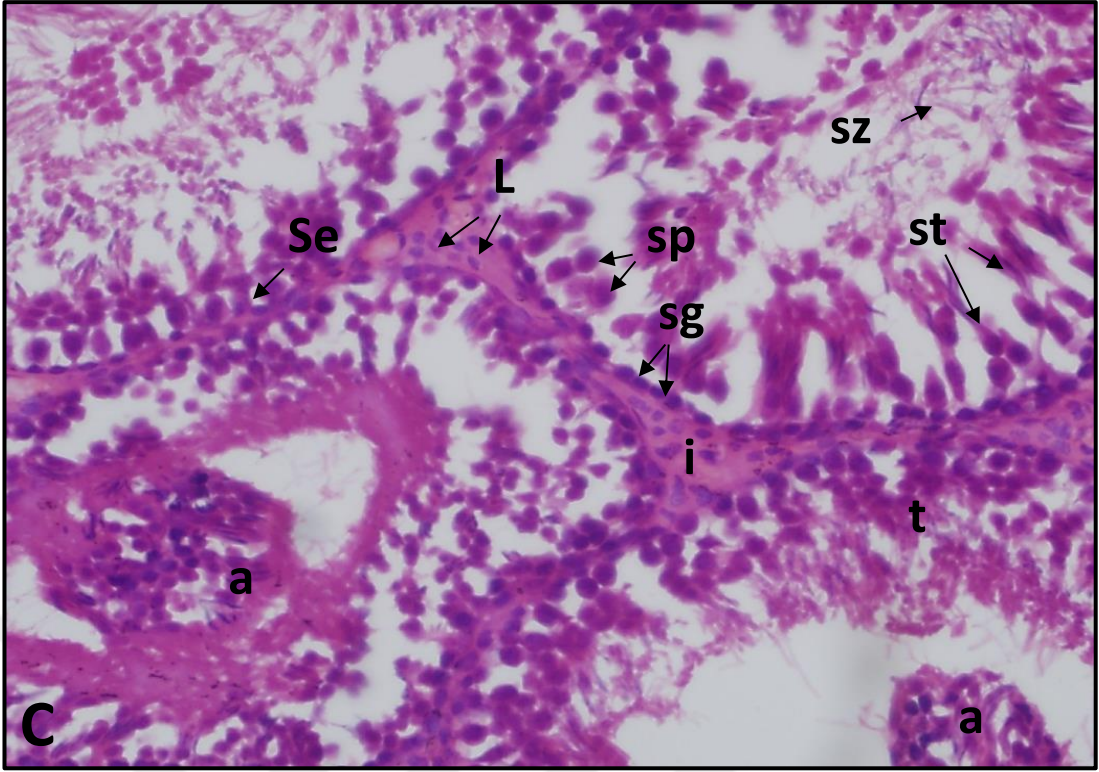


Şekil 3-4: Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde (A, B, C, D) seminifer tübüller (t), interstisyum (i), leydig hücreleri (L), spermatogonyumlar (sg), spermatositler (sp), spermatitler (st), spermatozoalar (sz) ve sertoli hücreleri (Se) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama; büyüme Ax10, Bx20, Cx40, Dx100.

DM grubuna ait testis histolojik kesitlerinde seminifer tübül sınırları düzgündür ve bazal lamina btnlgn korunmaktadır. Normal yapıdaki seminifer tübüllerin dışında çoğunlukla dilatasyon ile kombine dejenere tübül yapıları mevcuttur. Seminifer tübül bazal ve adluminal kompartmanlarında bulunan spermatogenik seri hücrelerinde dağımlar saptanmaktadır. Birçok alanda tübül lmeninedklmş atipik hücreler görülmektedir. Sertoli hücreleri olağan yapılarını korumuştur. İnterstisyel alana bakıldığında yoğun stromal fibrozis gözlenmektedir. Bazı alanlarda özellikle hilumdan başlayan interstisyel alan genişlemesi ile karakterize ödem tespit edilmiştir. Leydig hücre sayılarının azaldığı gözlenmiştir. Miyoepitel hücreler yapısal btnlgn korumuştur. Damarlarda hafif ölçekli hiperemi görülmektedir (şekil 3-5).



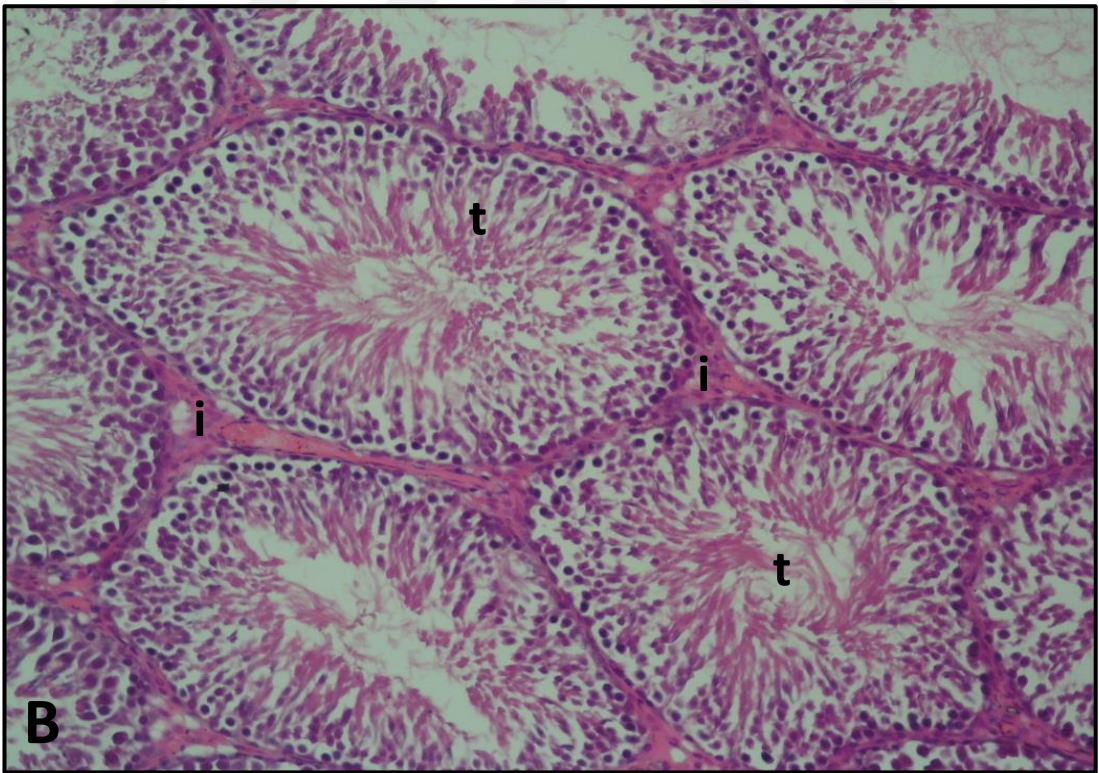


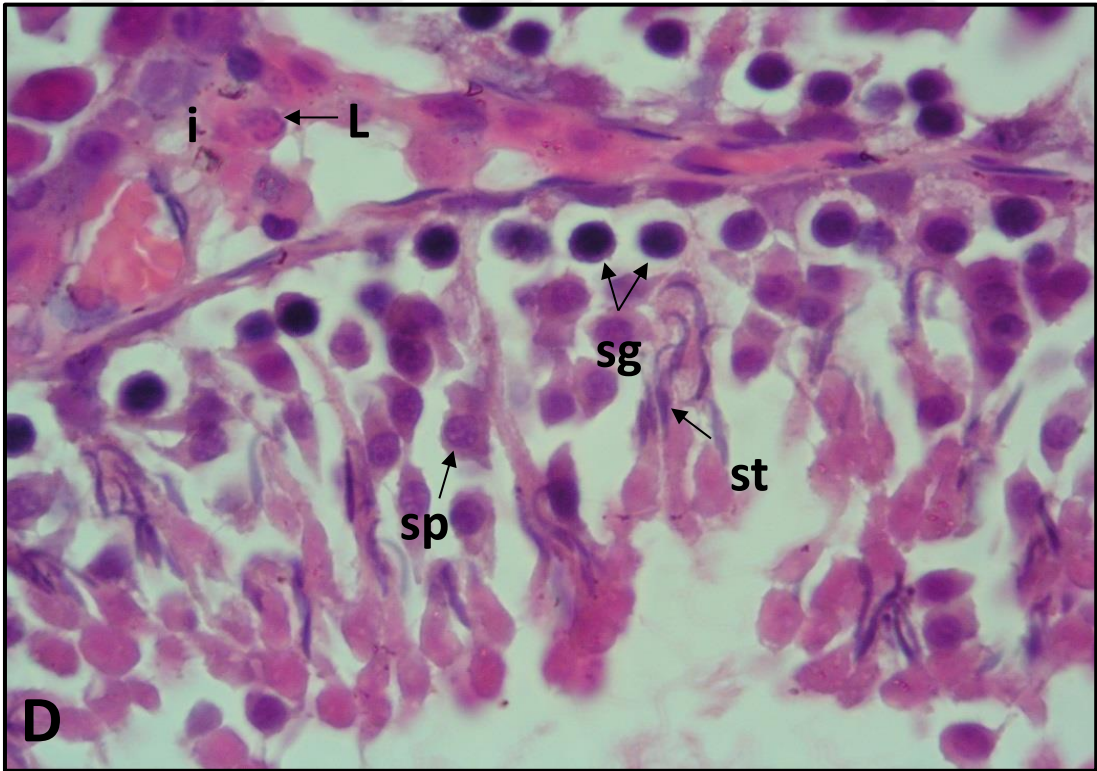
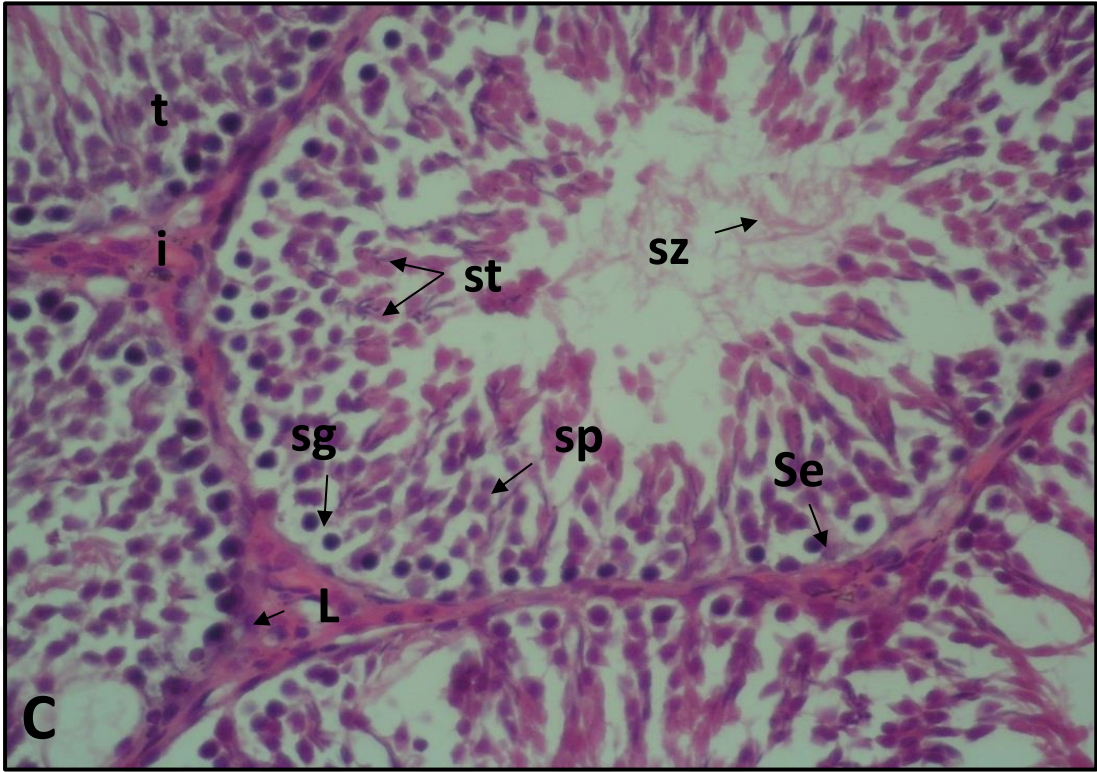


Şekil 3-5: DM grubuna ait histolojik kesitlerde (A, B, C, D) seminifer tübüller (t), interstisyum (i), leydig hücreleri (L), spermatogonyumlar (sg), spermatositler (sp), spermatitler (st), spermatozoalar (sz),sertoli hücreleri (Se), interstisyal alandaki ödem (*), lümene dökülmüş atipik hücreler (a), spermatogenik seri hücrelerindeki dejenerasyon (θ), stromal fibrozis (sf) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama; büyütme Ax10, Bx20, Cx40, Dx100

AGO grubuna ait testis histolojik kesitlerinde seminifer tübül sınırları belirgindir. DM grubu ile karşılaştırıldığında spermatogenik seri hücrelerdeki dağılmanın azaldığı gözlemlensede kontrol grubuna göre spermatazoa sayısında azalmalar mevcuttur. En belirgin bulgu interstisyumdaki ödem ve stromal fibrozisin önemli derecede azalmasıdır. Bağ dokusu kalınlığı kontrol grubunu anımsatmaktadır. Leydig ve miyoepitel hücreler yapısal bütünlüğünü korumuştur. Damarlarda hiperemi mevcut değildir (Şekil 3-6).



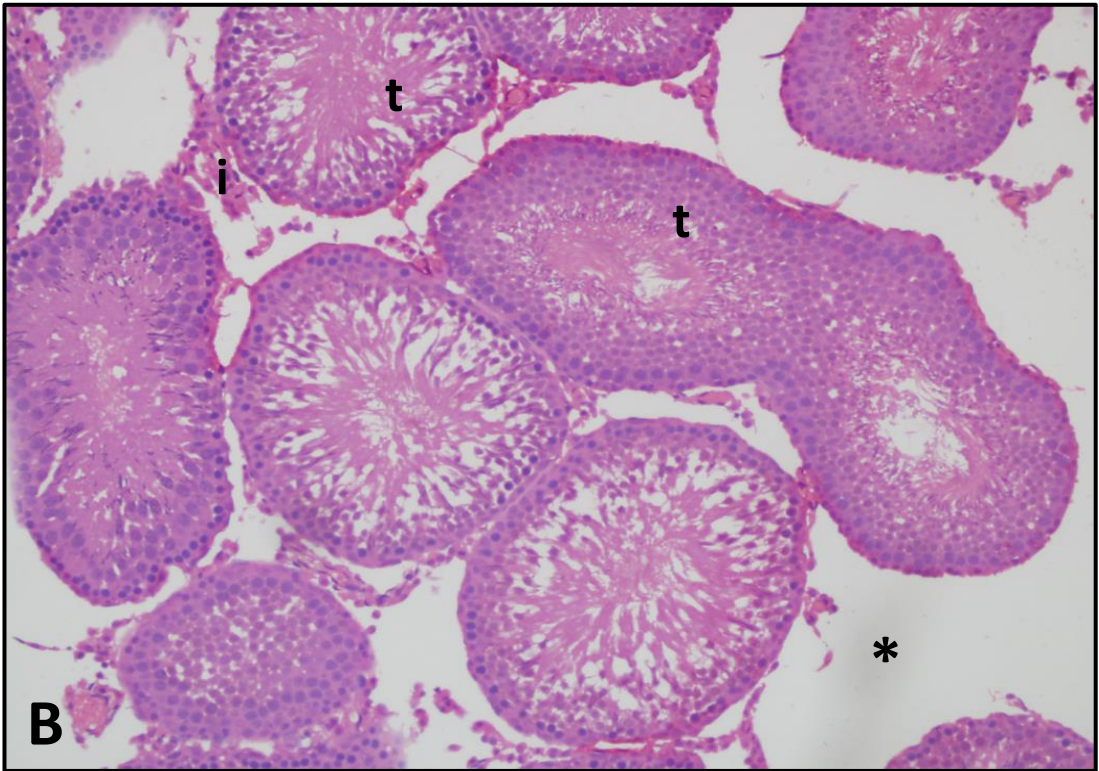
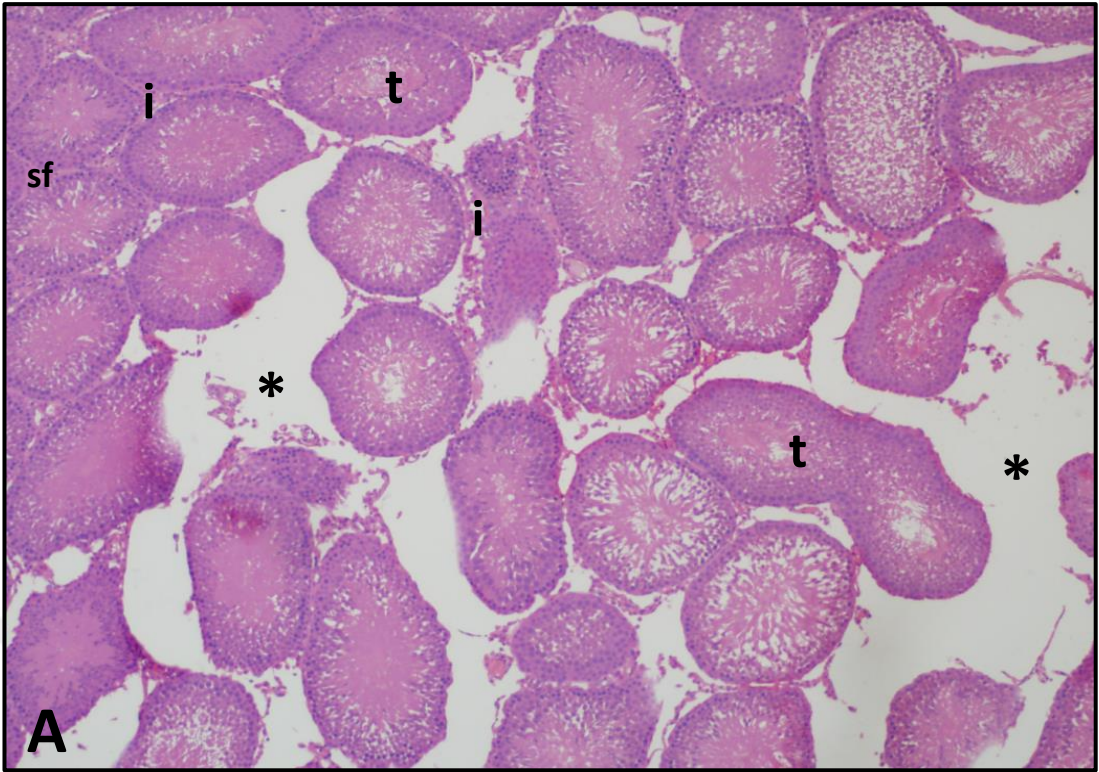


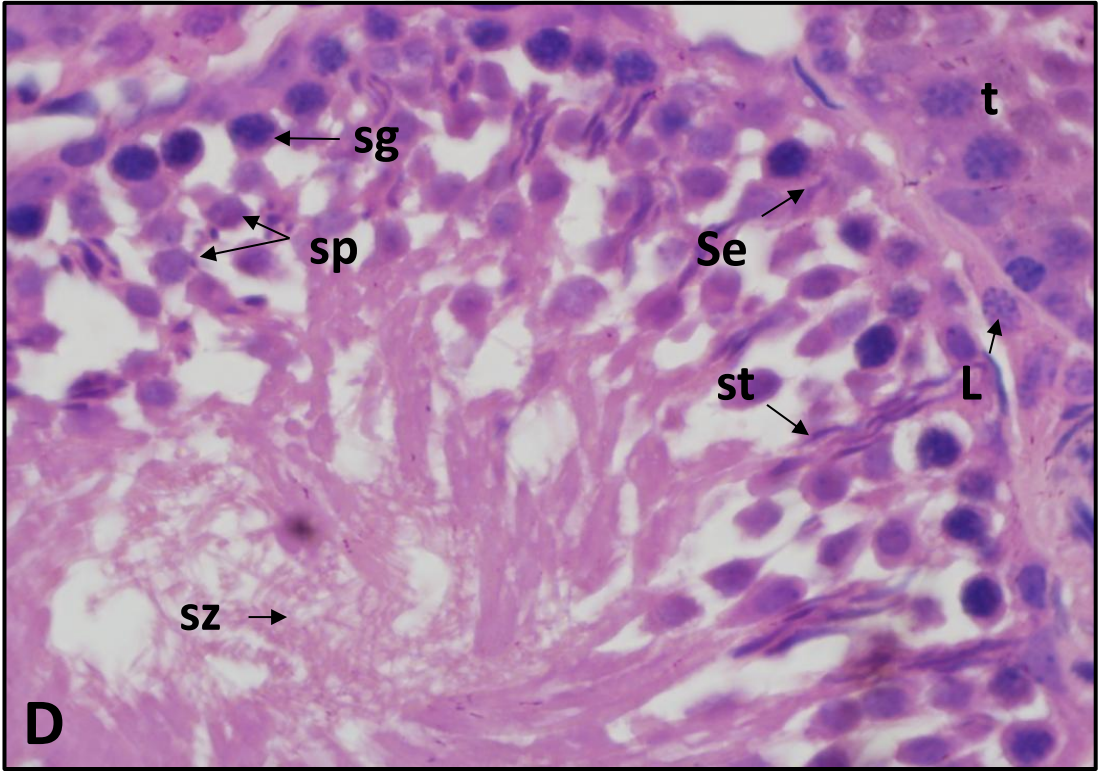
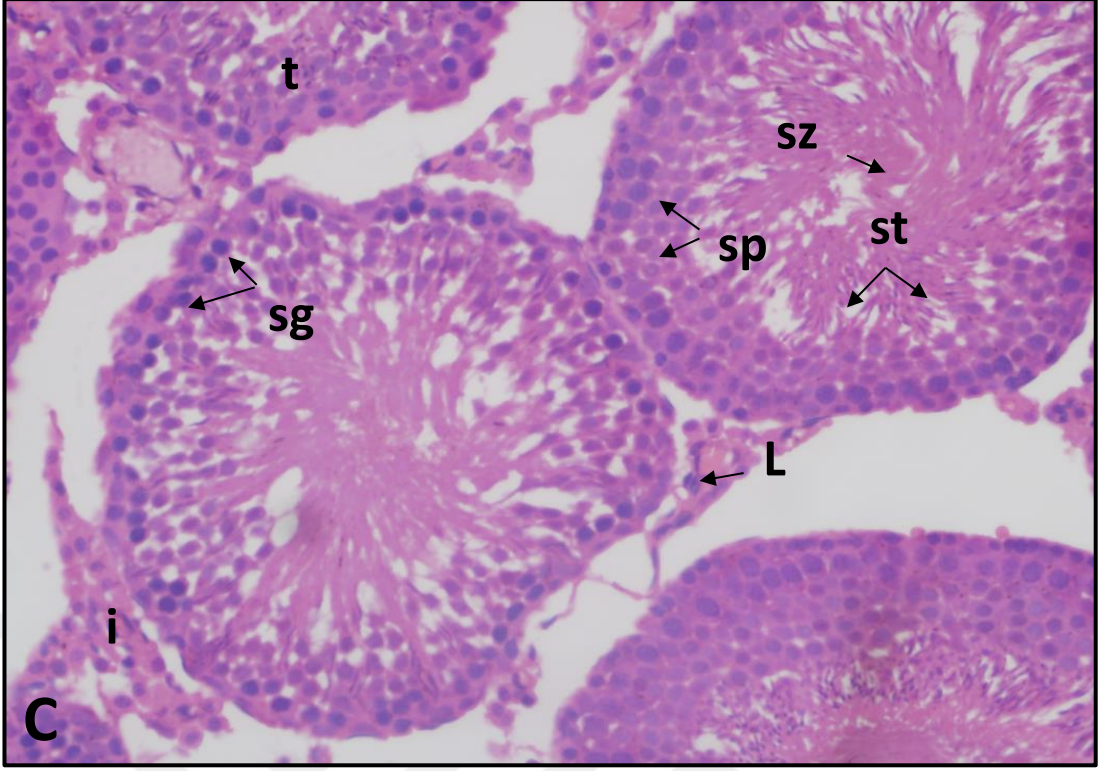


Şekil 3-6: AGO grubuna ait histolojik kesitlerde (A, B, C, D) seminifer tübüller (t), interstisyum (i), leydig hücreleri (L), spermatogonyumlar (sg), spermatositler (sp), spermatitler (st), spermatozoalar (sz) ve sertoli hücreleri (Se), görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama; büyütme Ax10, Bx20, Cx40, Dx100.

GAL grubuna ait testis histolojik kesitlerinde seminifer tübül sınırlarının belirgin olduğu görülmektedir. Spermatogenik seri hücrelerinin bütünlüğü kontrol grubuna oldukça benzemektedir. Yapısal organizasyon korunmuştur. DM grubu interstisyumunda gözlenen ödem azalmıştır, fakat kontrol grubuna göre stromal fibrozisin arttığı görülmektedir. Leydig ve miyoepitel hücreler yapısal bütünlüğünü korumuştur (şekil 3-7).







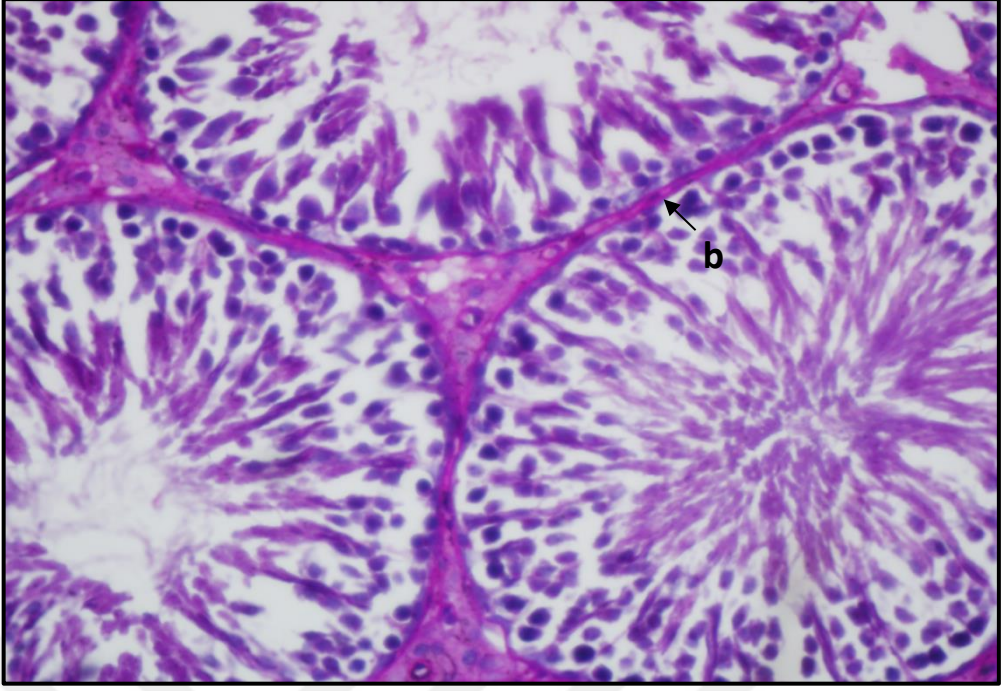
Şekil 3-7: GAL grubuna ait histolojik kesitlerde (A, B, C, D) seminifer tübüller (t), interstisyum (i), leydig hücreleri (L), spermatogonyumlar (sg), spermatositler (sp), interstisyal alandaki ödem (*), spermatitler (st), spermatozoalar (sz) ve sertoli hücreleri (Se), görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama; büyüme Ax10, Bx20, Cx40, Dx100.

3.2.2 PAS (Periyodik Asit Schiff) Boyama

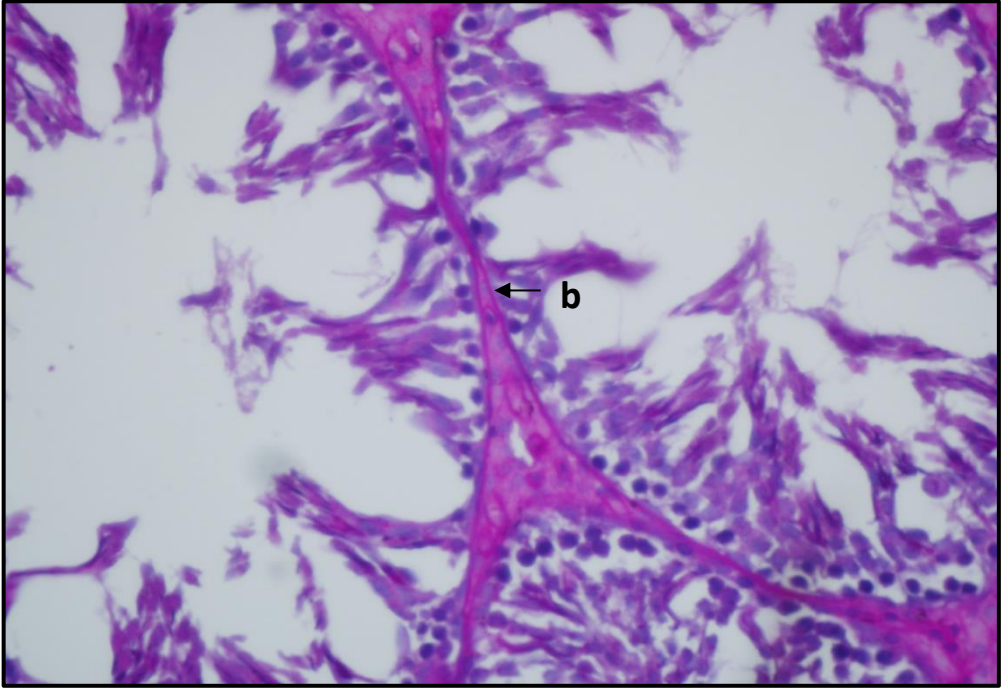
Kontrol grubuna ait sıçan testis dokuları PAS boyama yapılarak incelendiğinde spermatogenik seriye ait hücreler, seminifer tübüller, seminifer tübüllerin bazal laminası, sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri normal yapıda izlenmiştir.

DM grubu seminifer tübüllerinin bazal laminasında kontrol grubuna göre nispeten kalınlaşma olduğu görülmektedir (Şekil).

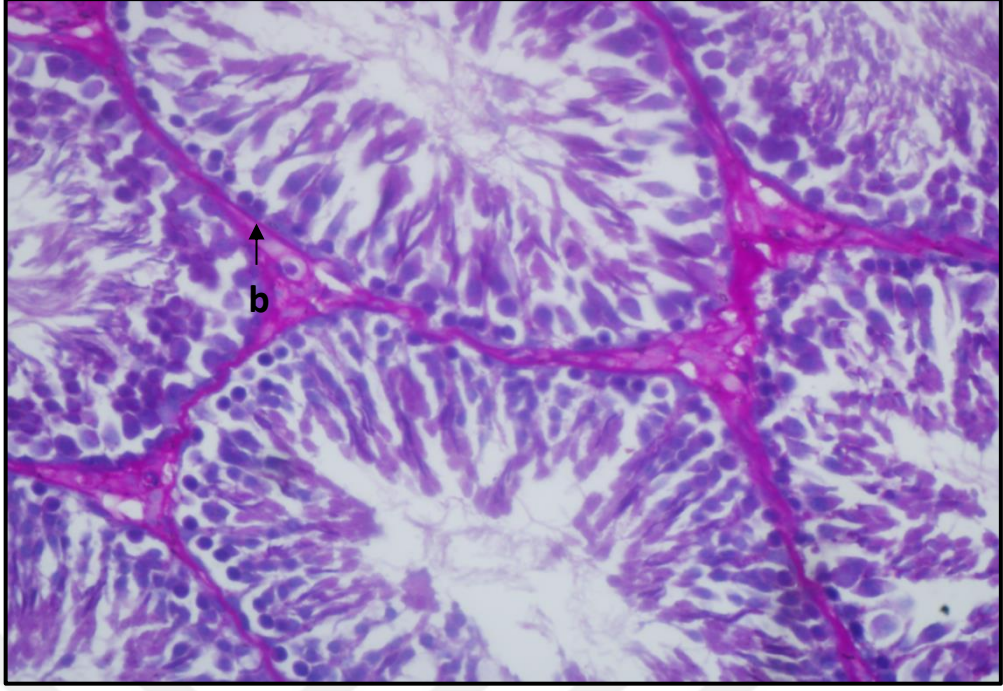
AGO ve GAL grubunda ise DM'de gözlenen bazal lamina kalınlaşmasının azaldığı ve kontrol grubuna yakın kalınlık gösterdiği görülmüştür (Şekil 3-8, 3-9, 3-10, 3-11).



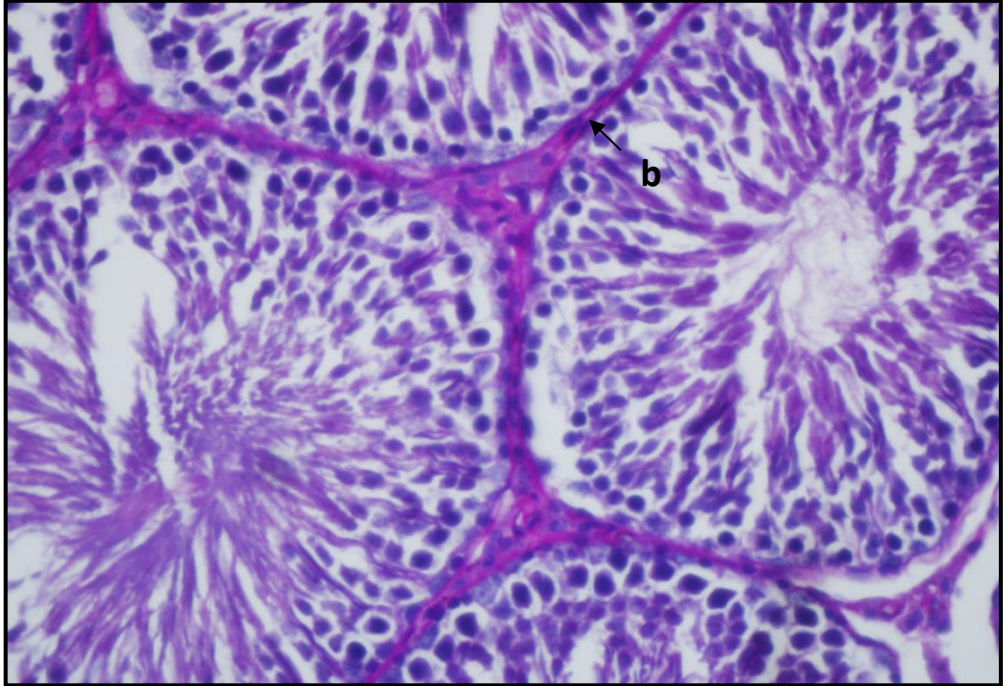
Şekil 3-8: Kontrol grubuna ait histolojik kesitin PAS boyanmasında bazal lamina (b), görülmektedir. PAS boyama; büyütme x40.



Şekil 3-9: DM grubuna ait histolojik kesitin PAS boyanmasında bazal lamina (b), görülmektedir. PAS boyama; büyütme x40.



Şekil 3-10: AGO grubuna ait histolojik kesitin PAS boyanmasında bazal lamina (b), görülmektedir. PAS boyama; büyüme x40.

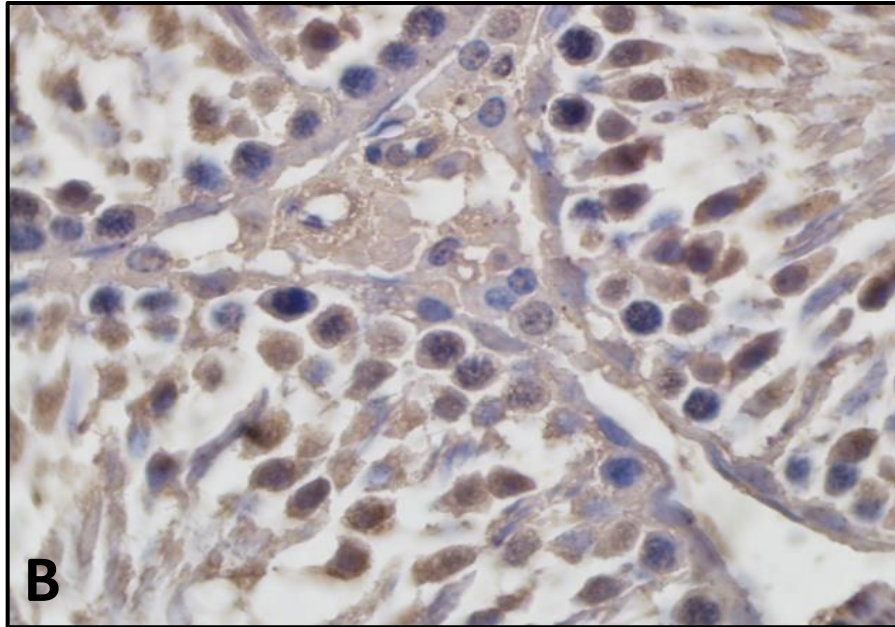
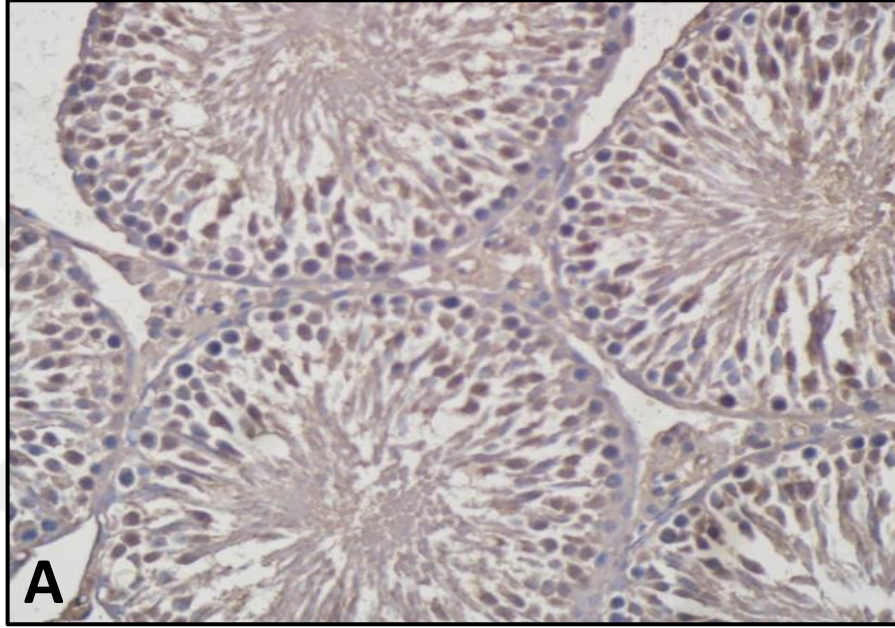


Şekil 3-11: GAL grubuna ait histolojik kesitin PAS boyanmasında bazal lamina (b), görülmektedir. PAS boyama; büyüme x40.

3.3 İmmünohistokimyasal Bulgular

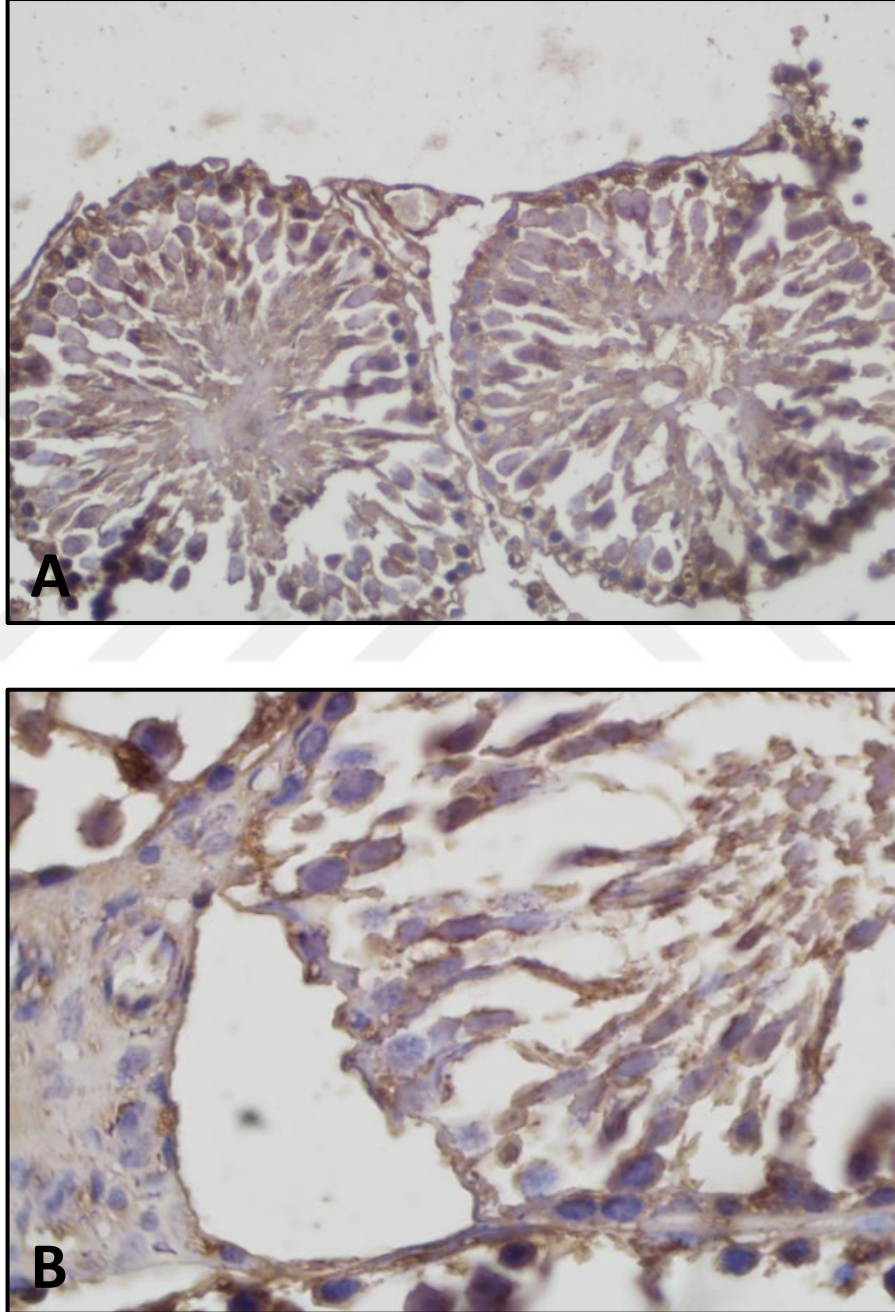
3.3.1 Fibronektin İmmunoreaktivitesi

Kontrol grubuna ait testis incelendiğinde tübül interstisyel alanı ve bazal laminada zayıf (+) ifade görülmüştür (şekil 3-12).



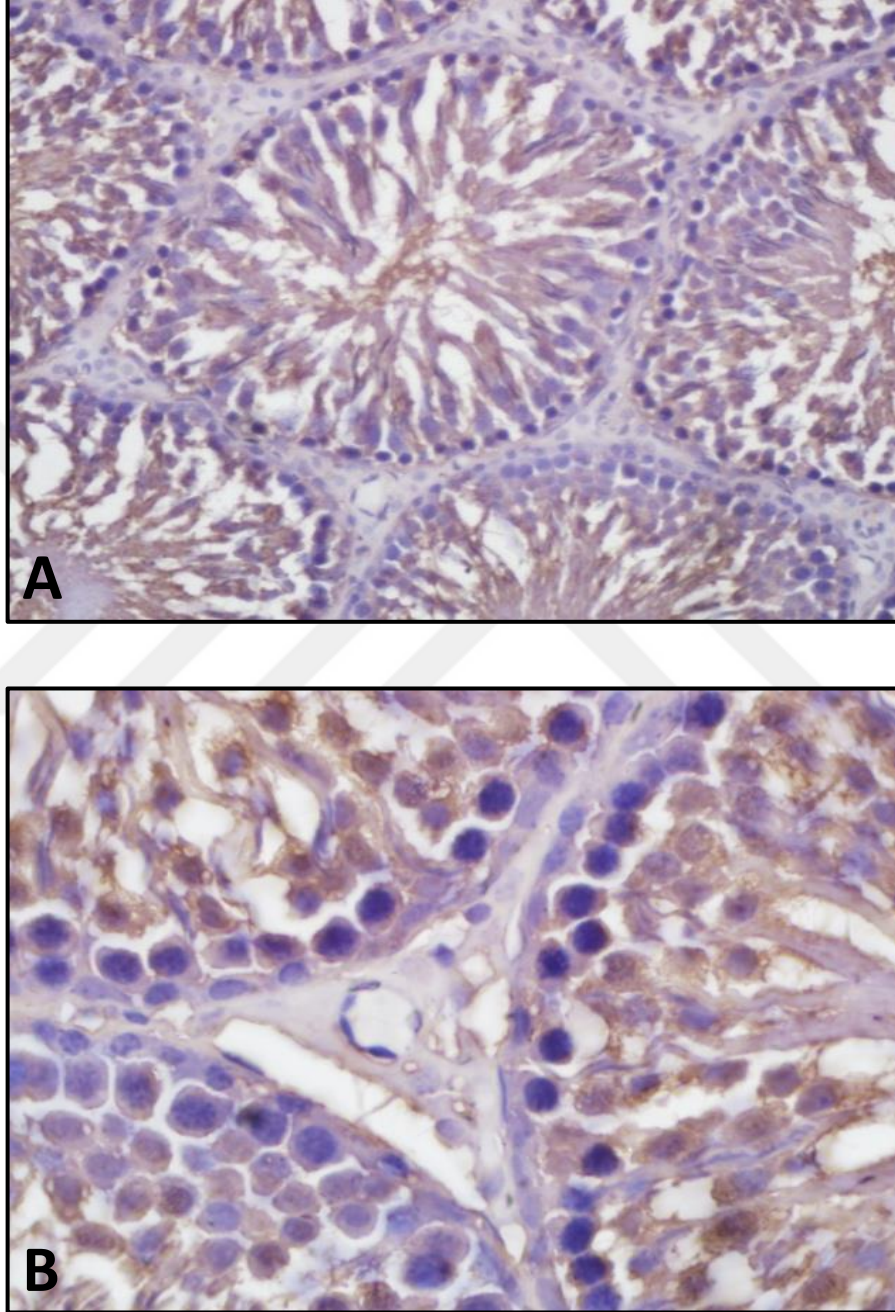
Şekil 3-12: Kontrol grubu fibronektin immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

DM grubunda interstisyel alan ve bazal laminada ifadenin oldukça güçlü (+++) olduğu görülmektedir. Fibronektinin yoğun ifadesi stromal fibrozisi işaret etmektedir (şekil 3-13)



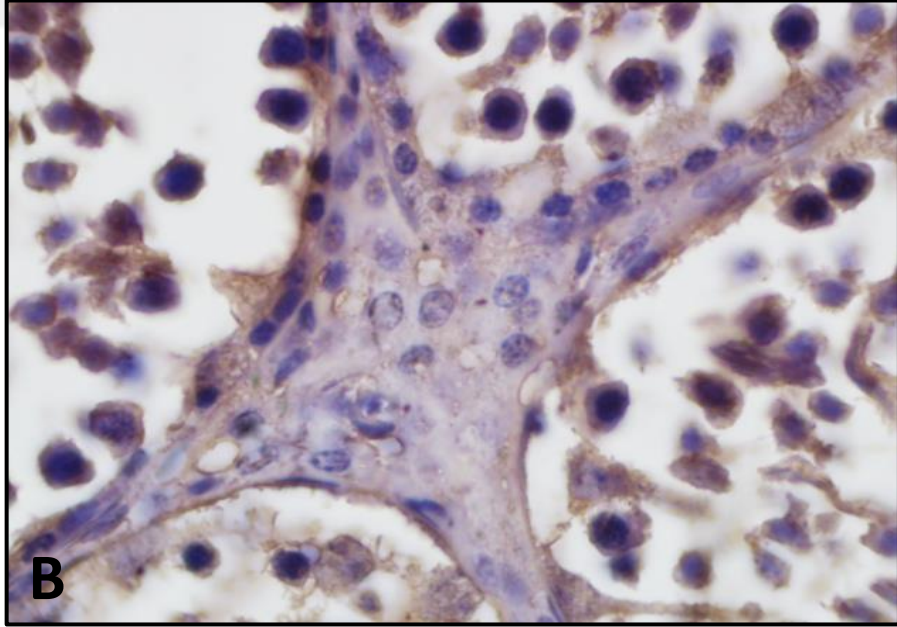
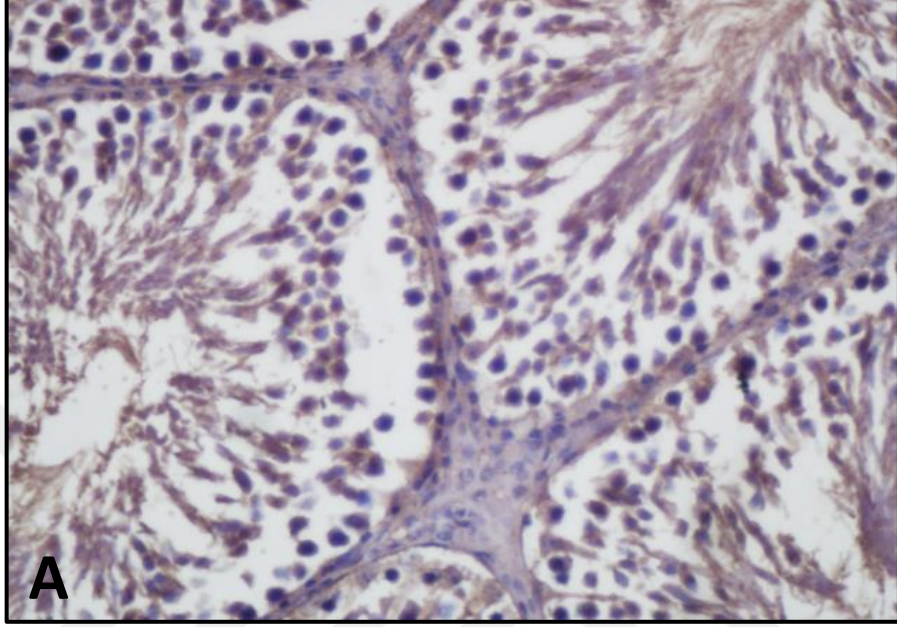
şekil 3-13: DM grubu fibronektin immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

AGO grubunda fibronektin ifadesi kontrol grubuna benzer şekilde zayıf görülmektedir (+) (Şekil 3-14).



Şekil 3-14: AGO grubu fibronektin immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

GAL grubunda fibronektin ifadesi kontrol grubuyla kıyaslandığında orta düzeyde görülmektedir (++) (Şekil 3-15).

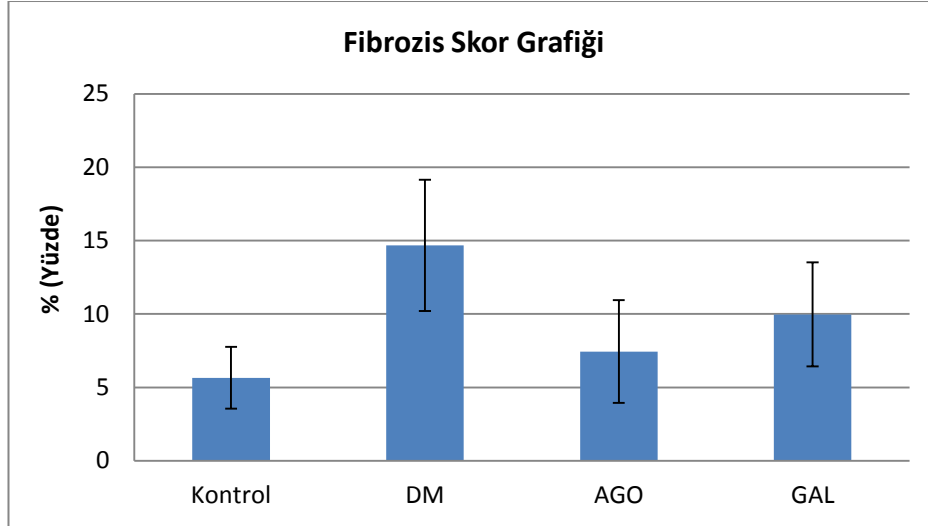


Şekil 3-15: GAL grubu fibronektin immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

Tablo 3-6: Testise ait kesitlerde fibronektin immunohistokimyasal immunoreaktivitesi bazlı stromal fibrozis skor tablosu (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir).

Stromal Fibrozis Skor Tablosu (% Alan Sayımı)				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	5,10±1,25	12,10±0,93	6,70±1,12	8,30±0,19
2	4,30±0,68	15,30±1,02	12,71±1,02	7,60±0,92
3	5,16±0,32	17,14±0,87	3,13±0,93	11,50±0,23
4	4,30±1,13	21,60±1,45	8,20±0,55	14,90±1,29
5	8,10±1,27	8,30±0,32	6,10±1,22	14,20±1,26
6	9,10±1,22	11,20±1,25	11,10±1,14	6,20±0,24
7	3,50±1,41	17,13±1,69	4,13±1,31	7,12±1,13
Ortalama	5,651±1,04	14,681±1,07	7,438±1,04	9,974±0,75

K-DM	p=0,000*
DM-AGO	p=0,002*
DM-GAL	p=0,024*
AGO-GAL	p=0,101

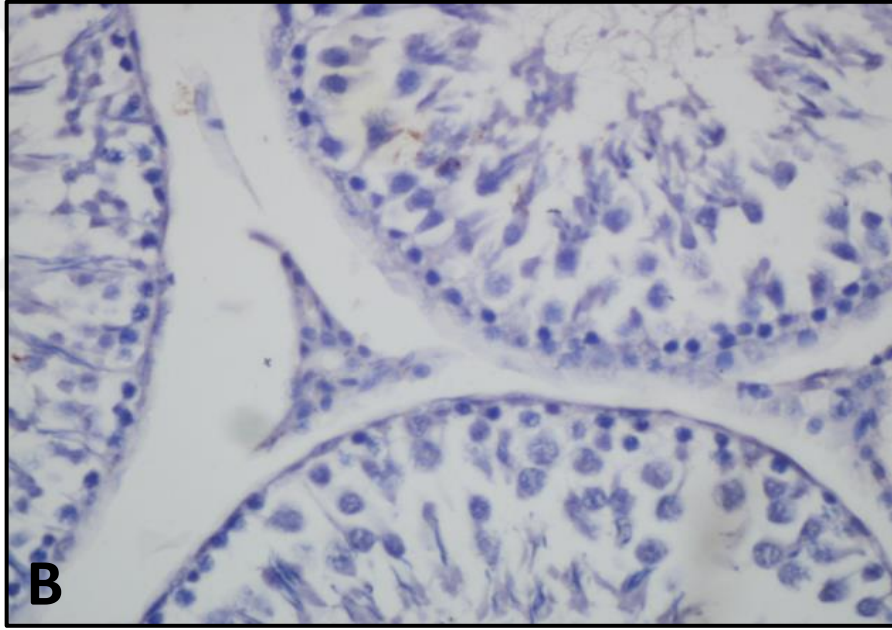
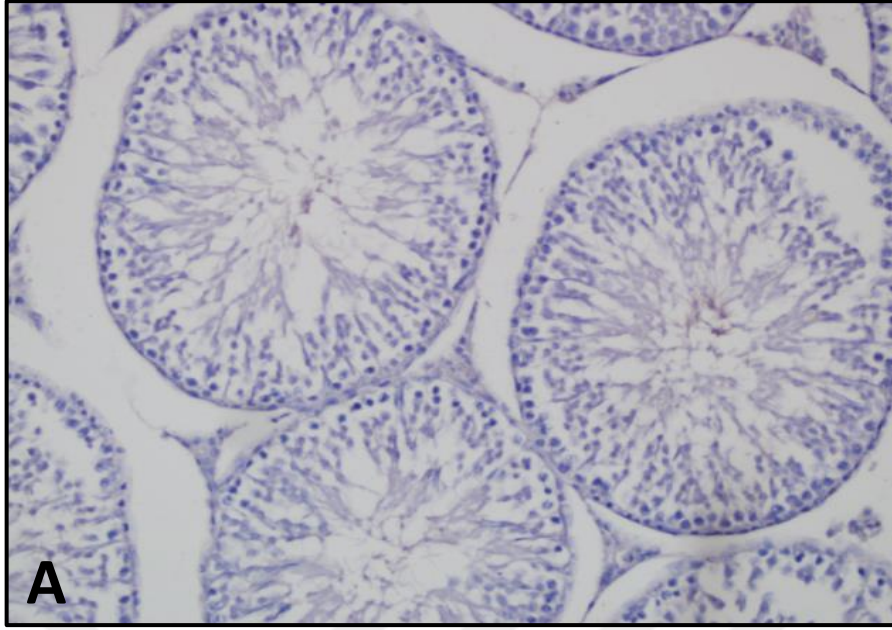


Şekil 3-16: Fibrozis skor grafiği.

Fibrozis skorunun belirlenmesi için her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 alan Image-Pro Express 4.5 programı ile incelenmiştir. Kontrol, DM, AGO ve GAL grubu sıçan testis histolojik kesitleri değerlendirilerek fibrozis skorları Tablo 3-6'da belirtilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonuçlarına göre AGO ve GAL grubundaki stromal fibrozis azalması DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05^*$ seviyesinde istatistiksel anlamlılık). Şekil 3-16' da fibrozis skor grafiği görülmektedir.

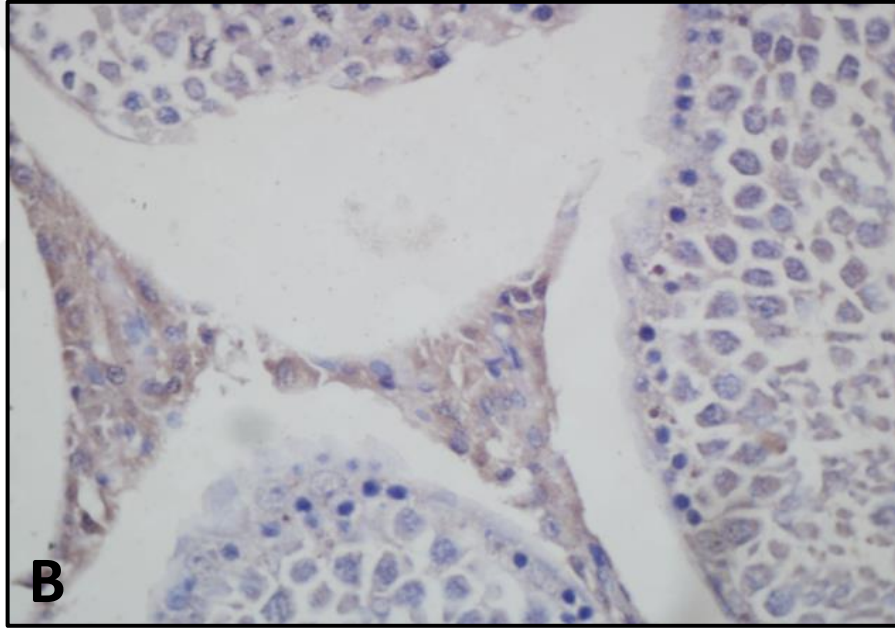
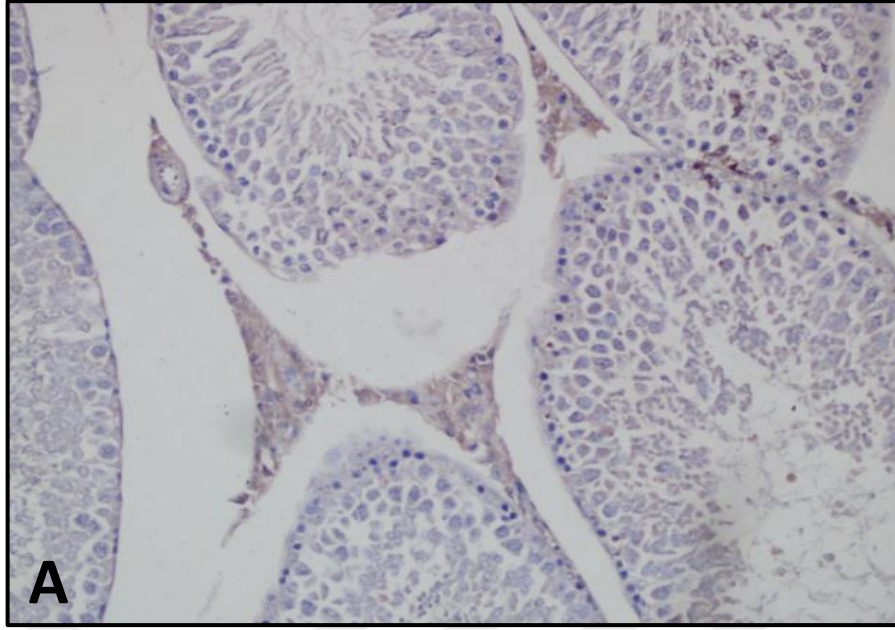
3.3.2 NOS2 İmmunoreaktivitesi

Kontrol grubu testis preparatı incelendiğinde interstisyel alandaki hücreler ve Leydig hücrelerinde zayıf (+) NOS2 ifadesi görülürken, spermatogenik seri hücrelerinde NOS2 ifadesi görülmemiştir (Şekil 3-17).



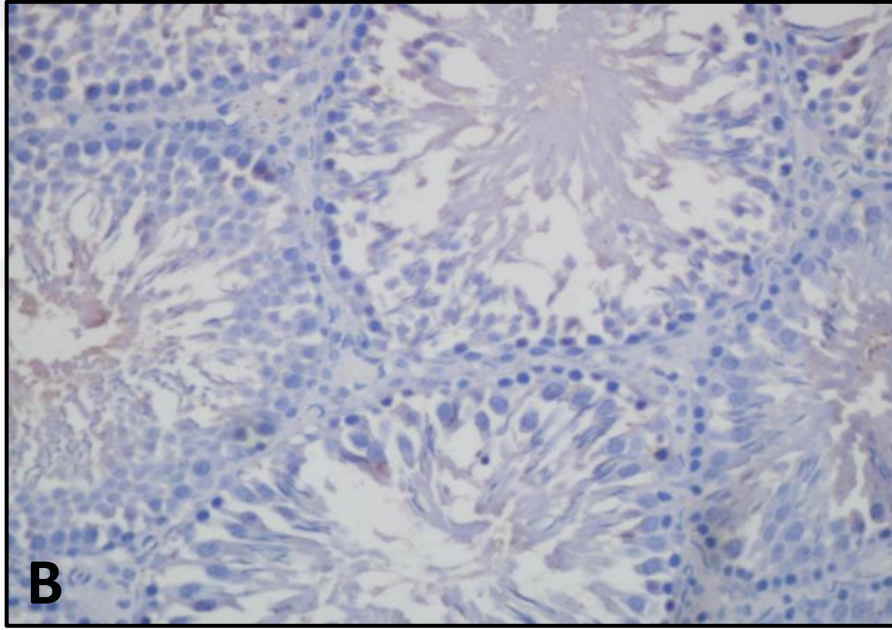
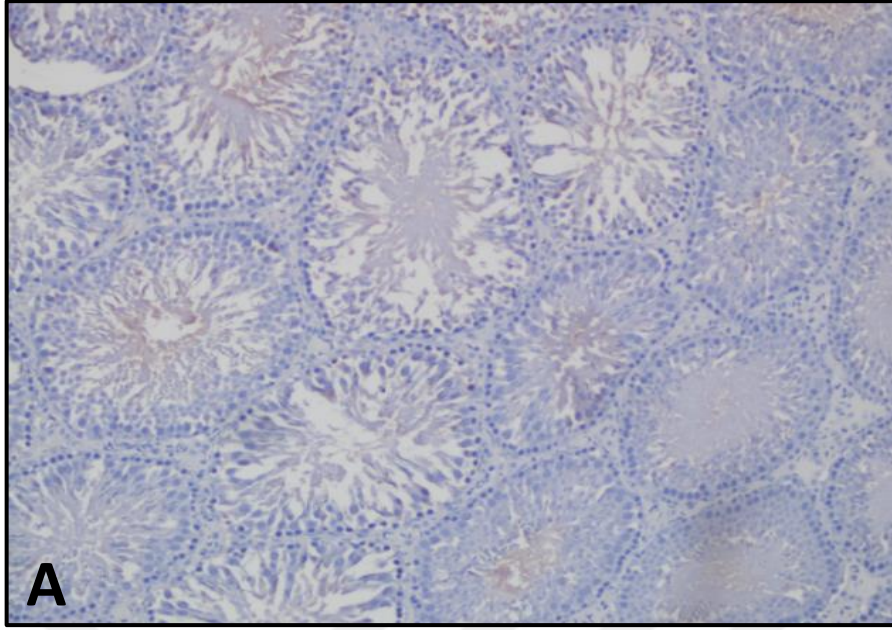
Şekil 3-17: Kontrol grubu NOS2 immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

DM grubunda interstisyel alandaki hücreler ve leydig hücrelerindeki ifadenin belirgin şekilde arttığı (+++) ayrıca spermatositlerde orta düzeyde (++) ifade sağlandığı görülmektedir. Spermatitlerde ifade zayıftır (+) (Şekil 3-18).



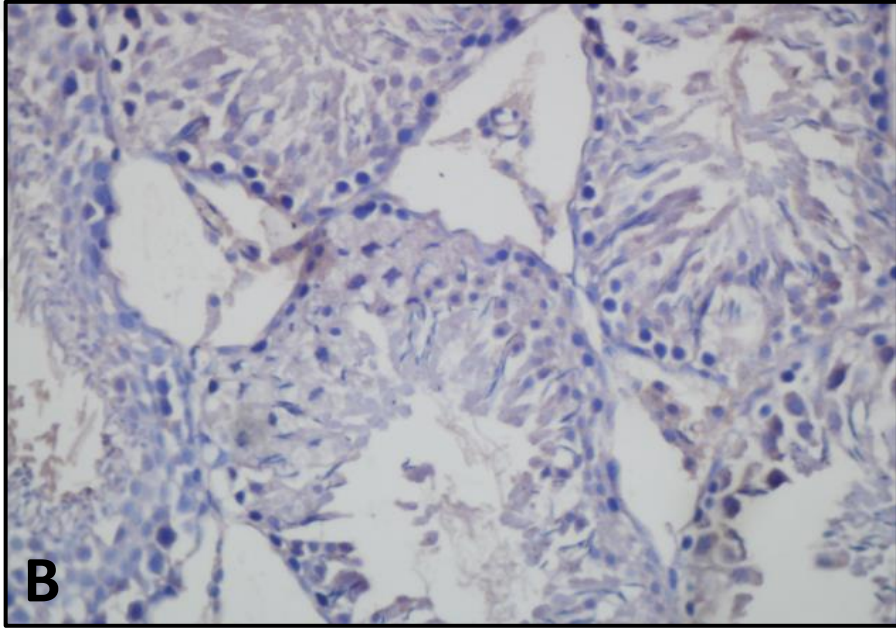
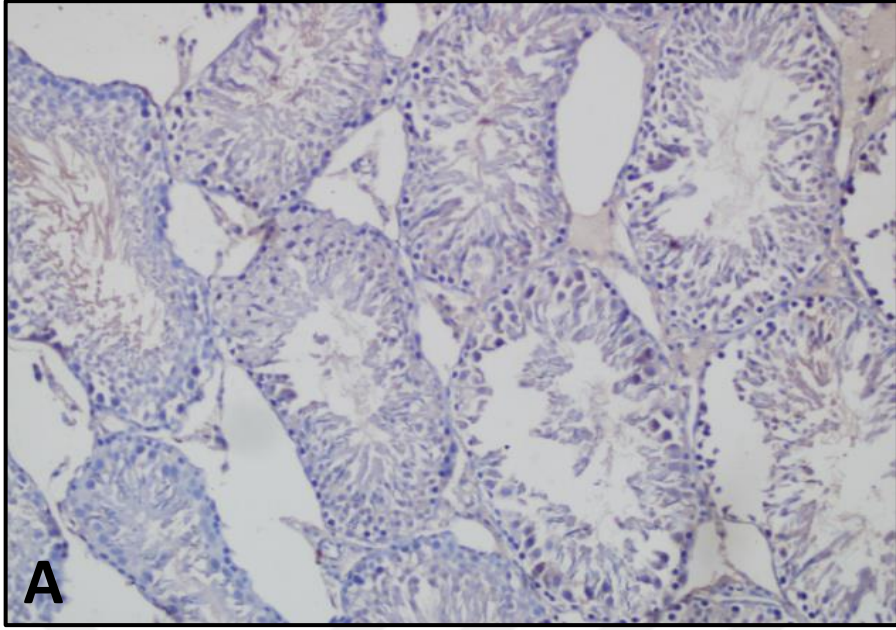
Şekil 3-18: DM grubu NOS2 immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

AGO grubunda NOS2 ifadesinin interstisyel alandaki hücreler, leydig hücreleri ve spermatitlerde oldukça zayıf olduğu (+) görülmektedir (Şekil 3-19).



Şekil 3-19: AGO grubu NOS2 immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

GAL grubunda leydig hücrelerinde ve interstisyel alandaki hücrelerde kontrole (+) benzerdir. Primer spermatositlerde ve spermatitlerde zayıf ifade (+) gözlenmiştir (Şekil 3-20). Tüm gruplara ait immunoreaktif hücre yüzdesi ve ifadelendirme şiddetleri Tablo 3-7’de verilmiştir.



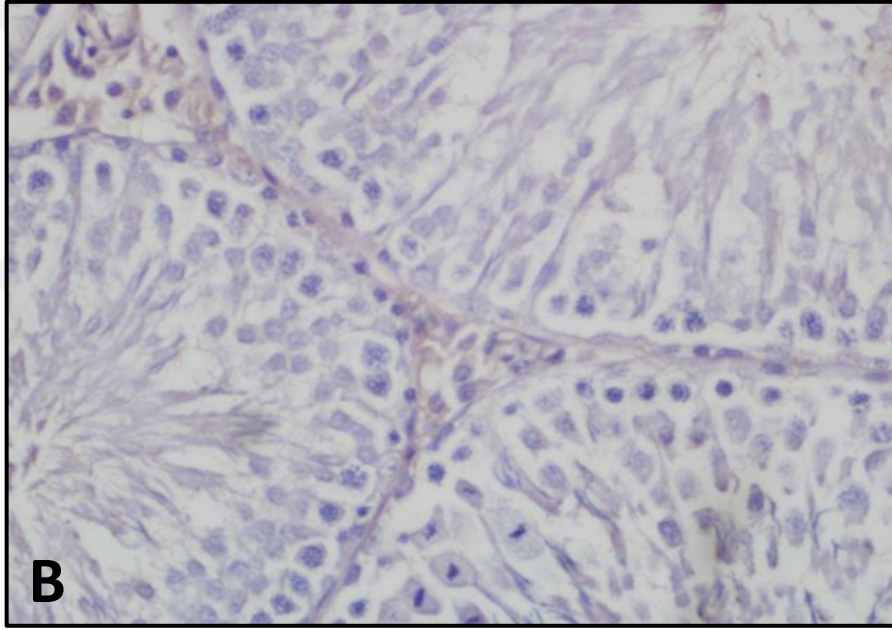
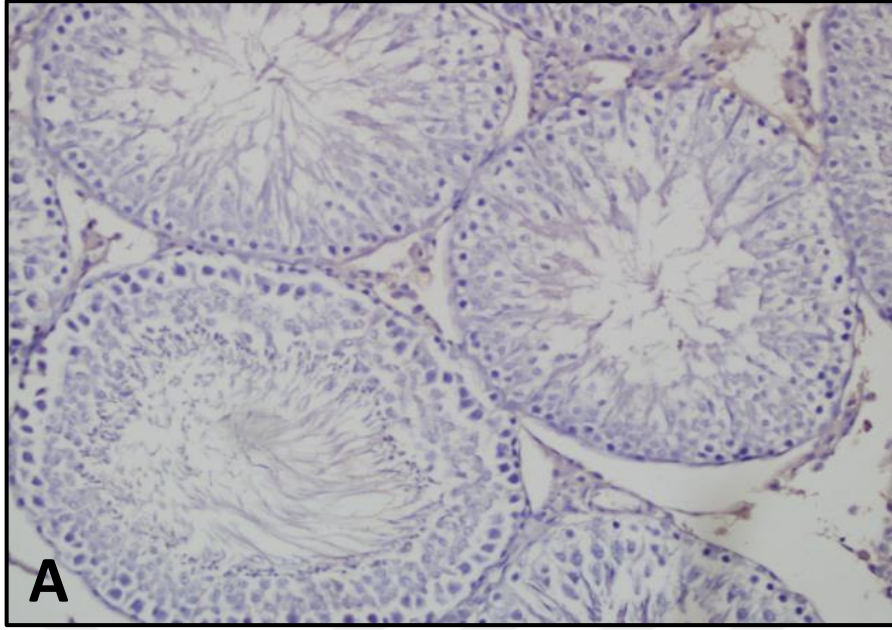
Şekil 3-20: GAL grubu NOS2 immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

Tablo 3-7: Testise ait kesitlerde seminifer tübül ve interstisyuma ait hücrelerdeki NOS2 immunohistokimyasal immunoreaktivitesi (+) hücre sayısı yüzdeleri ile ifade şiddetleri (-: Boyanmamış; (+)1: Zayıf boyanmış; (+)2: Orta derecede boyanmış; (+)3: Güçlü boyanmış).

İmmuno reaktivite	Yaklaşık (~) % immunoreaktif (+) hücre yüzdesi ve ifadenme şiddetleri																								
	Spermatogonyum				Spermatosit				Spermatid				Sertoli				Leydig Hücreleri				İnterstisyel Hücreler				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
NOS2	Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~% 5	~% 95	-	-	~% 19	~% 81	-	-
	DM	-	-	-	-	~% 10	~% 5	~% 85	-	~% 3	~% 97	-	-	-	-	-	-	~% 4	~% 96	-	-	~% 4	~% 96	-	-
	AGO	-	-	-	-	-	-	-	-	~% 30	~% 70	-	-	-	-	-	-	~% 16	~% 84	-	-	~% 64	~% 36	-	-
	GAL	-	-	-	-	~% 10	~% 85	~% 5	-	~% 18	~% 80	%2	-	-	-	-	-	~% 5	~% 95	-	-	~% 24	~% 76	-	-

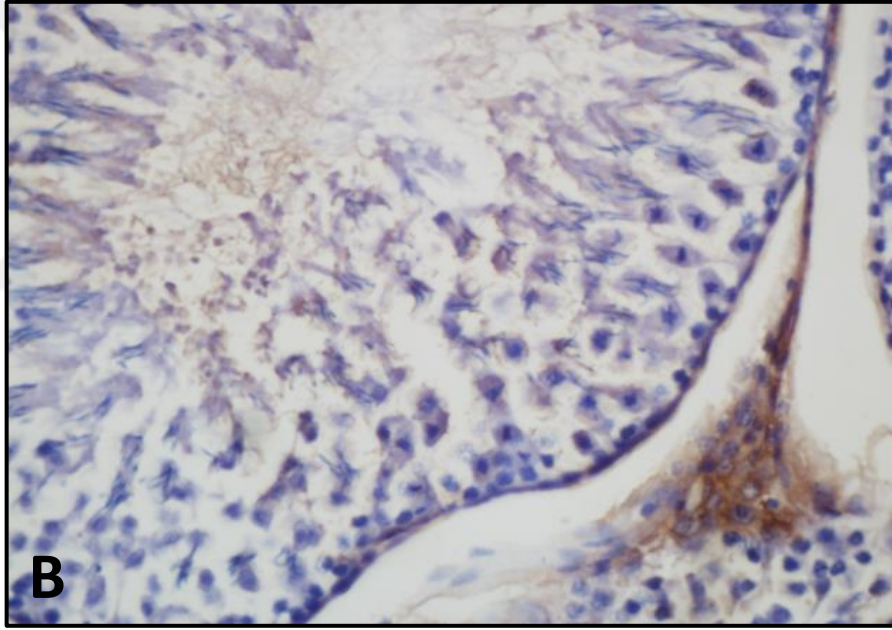
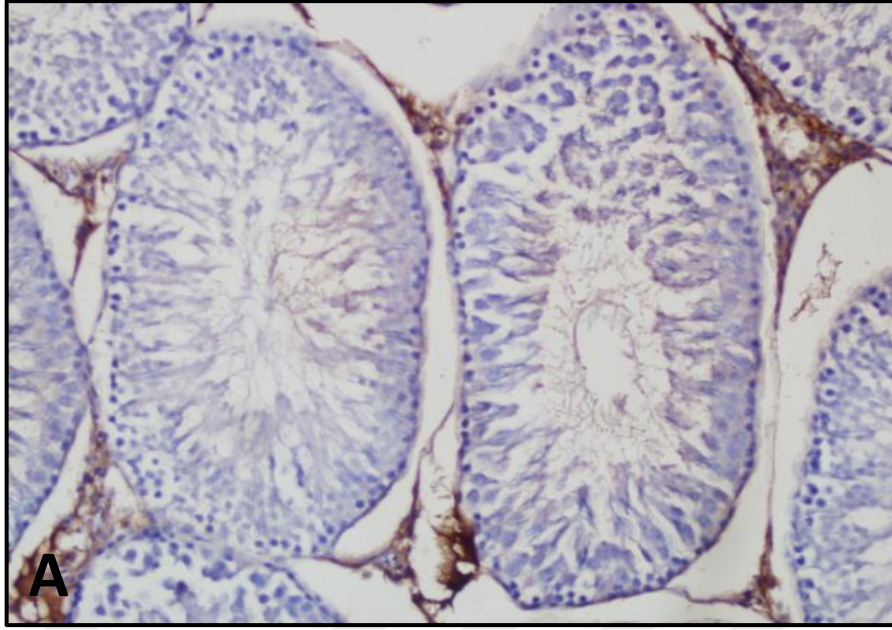
3.3.3 TNF α İmmunoreaktivitesi

TNF α ifadesi kontrol grubu testis preparatında interstisyel alandaki hücreler ve leydig hücrelerinde zayıftır (+) (Şekil 3-21).



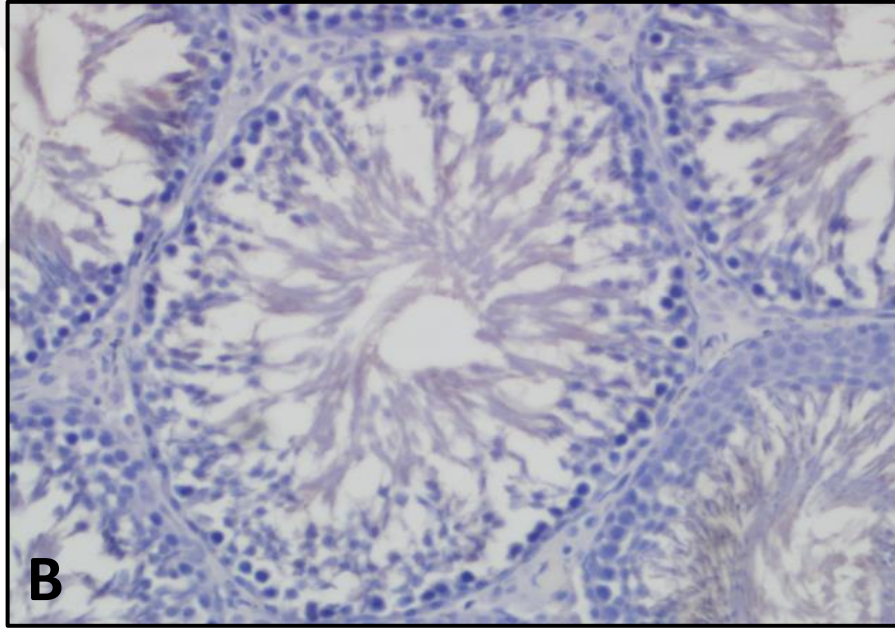
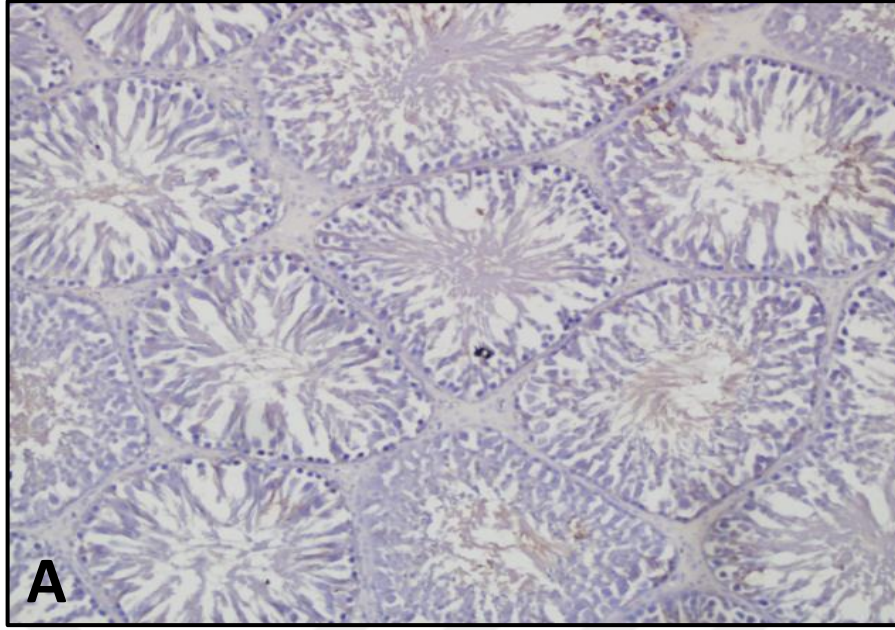
Şekil 3-21: Kontrol grubu TNF α immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

DM grubunda interstisyel alandaki hücreler ve leydig hücrelerindeki ifadenin belirgin şekilde arttığı (+++) izlenmektedir (Şekil 3-22).



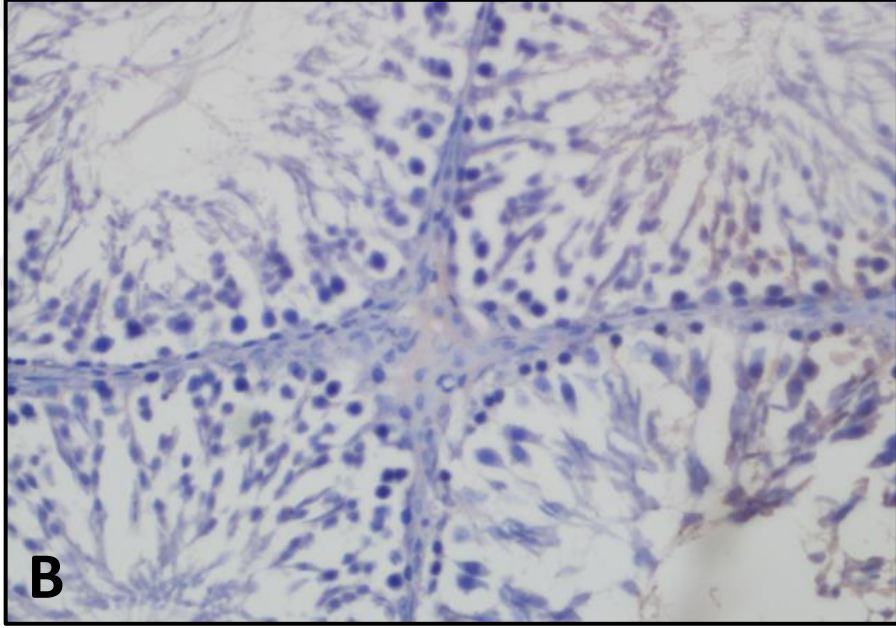
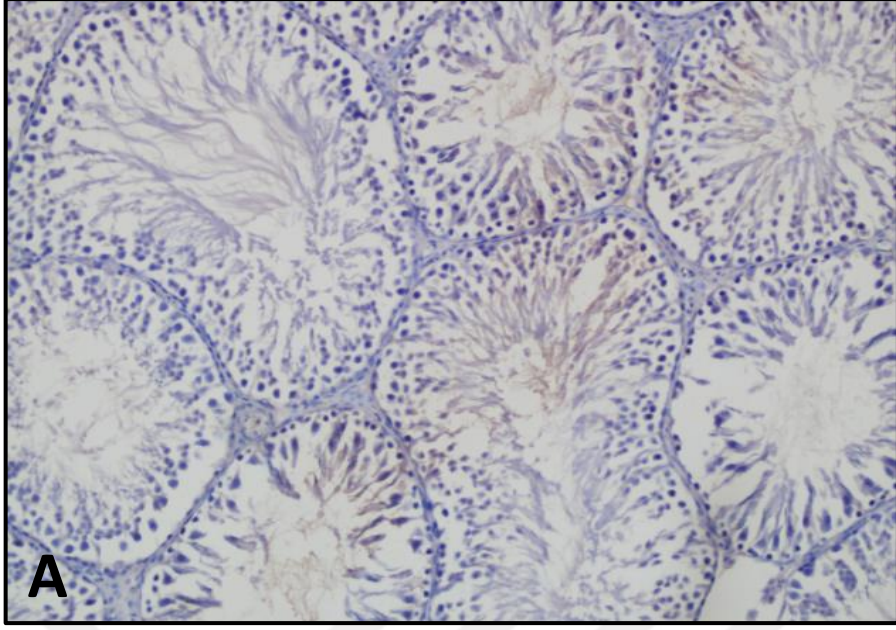
Şekil 3-22: DM grubu TNF α immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

AGO grubundainterstisyel alandaki hücreler ve leydig hücrelerinde görülen TNF α ifadesi kontrol grubuna (+) benzerdir (Şekil 3-23).



Şekil 3-23: AGO grubu TNF α immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

GAL grubunda intestisyel hücreler ve leydig hücrelerinde görülen TNF α ifadesi kontrol grubuna (+) benzerdir (Şekil 3-24). Tüm gruplara ait immunoreaktif hücre yüzdesi ve ifadelenme şiddetleri Tablo 3-8’de verilmiştir.



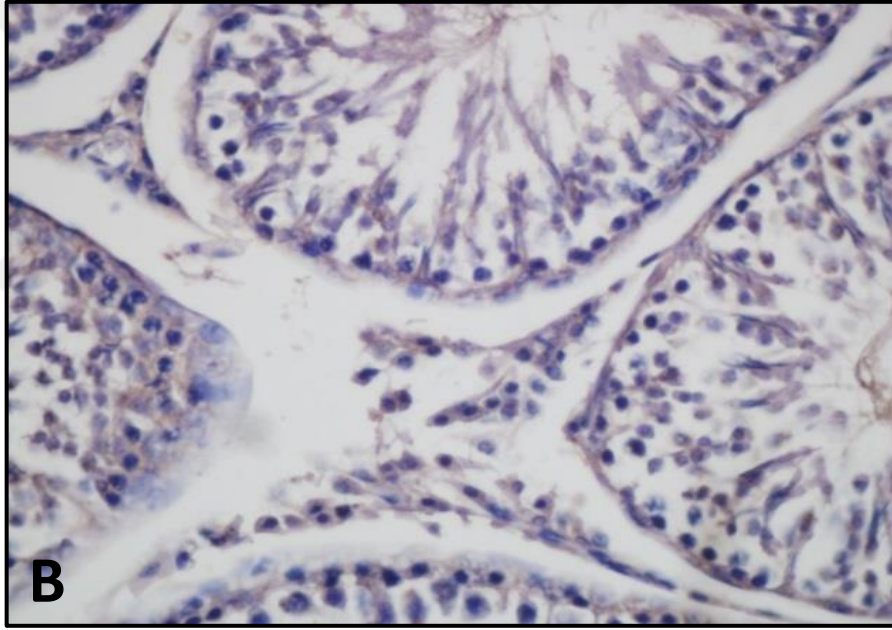
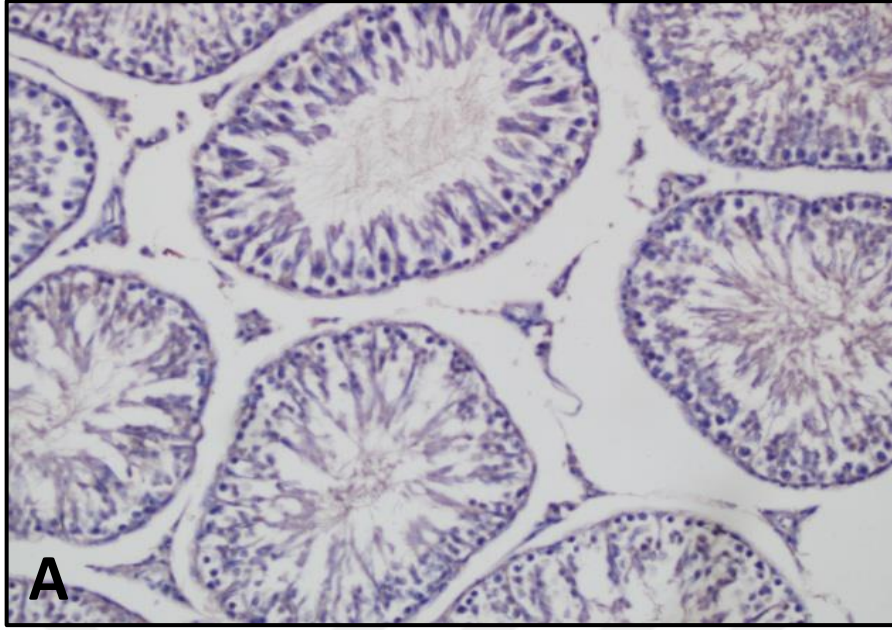
Şekil 3-24: GAL grubu TNF α immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

Tablo 3-8: Testise ait kesitlerde seminifer tübül ve interstisyuma ait hücrelerdeki TNF α immunohistokimyasal immunoreaktivitesi (+) hücre sayısı yüzdeleri ile ifade şiddetleri (-: Boyanmamış; (+)1: Zayıf boyanmış; (+)2: Orta derecede boyanmış; (+)3: Güçlü boyanmış).

İmmuno reaktivite	Yaklaşık (~) % immunoreaktif (+) hücre yüzdesi ve ifadenme şiddetleri																												
	Spermatogonyum				Spermatosit				Spermatid				Sertoli				Leydig Hücreleri				İnterstisyel Hücreler								
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3					
TNF- α	Kontrol	~% 10	~% 90	.	.	~% 10	~% 90	.	.
	DM	~% 100	~% 100
	AGO	~% 25	~% 75	.	.	~% 15	~% 85	.	.
	GAL	~% 20	~% 80	.	.	~% 10	~% 90

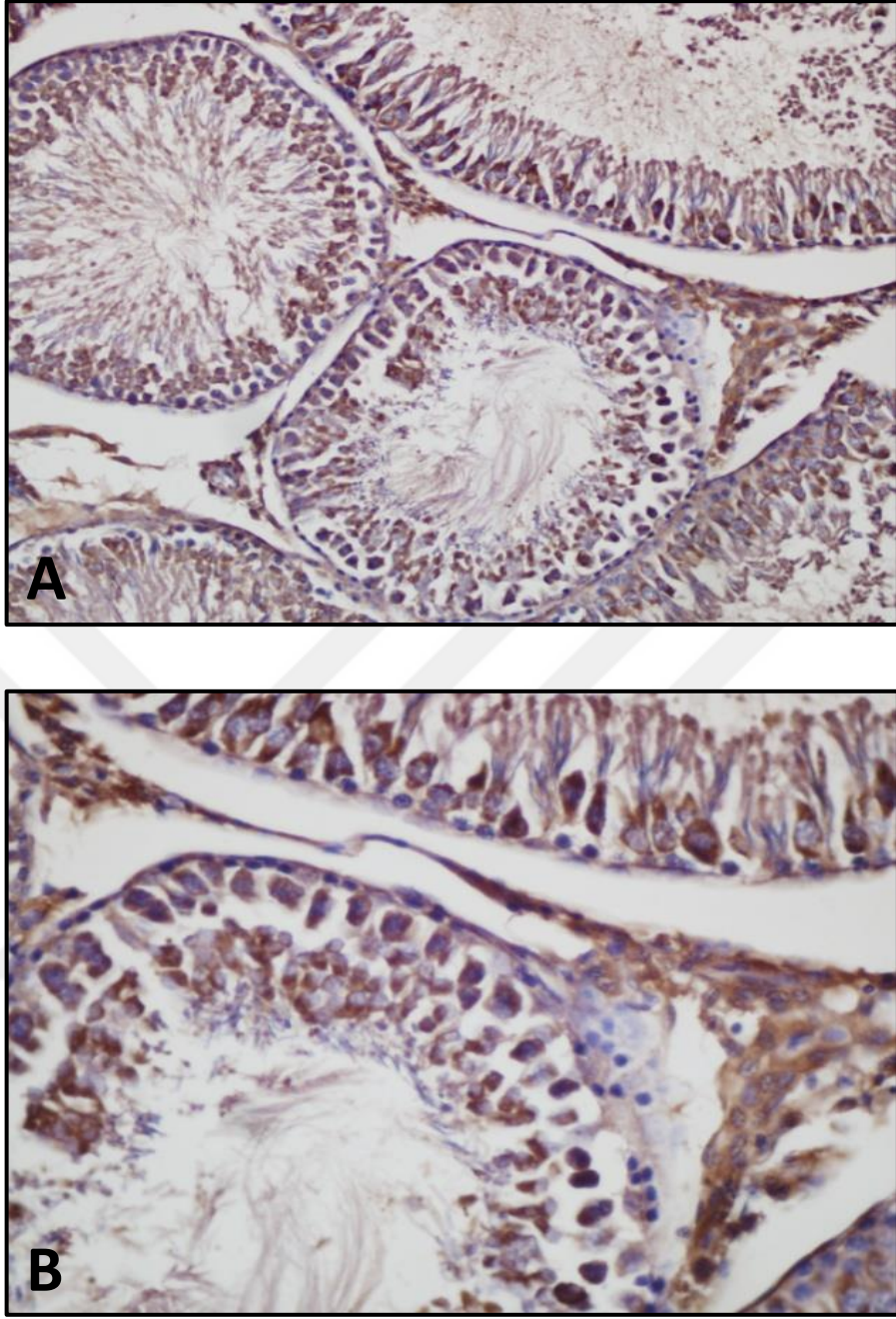
3.3.4 VEGF İmmunoreaktivitesi

VEGF ifadesinin kontrol grubunda spermatogonial hücreler boyunca zayıf (+) olduğu görülmektedir. İnterstisyel alanda ifade gözlenmemiştir (Şekil 3-25).



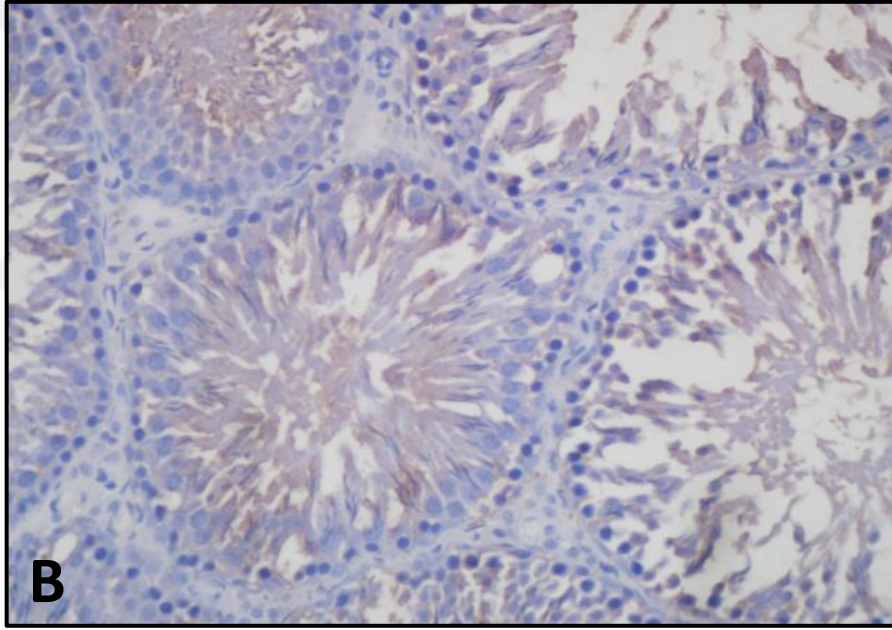
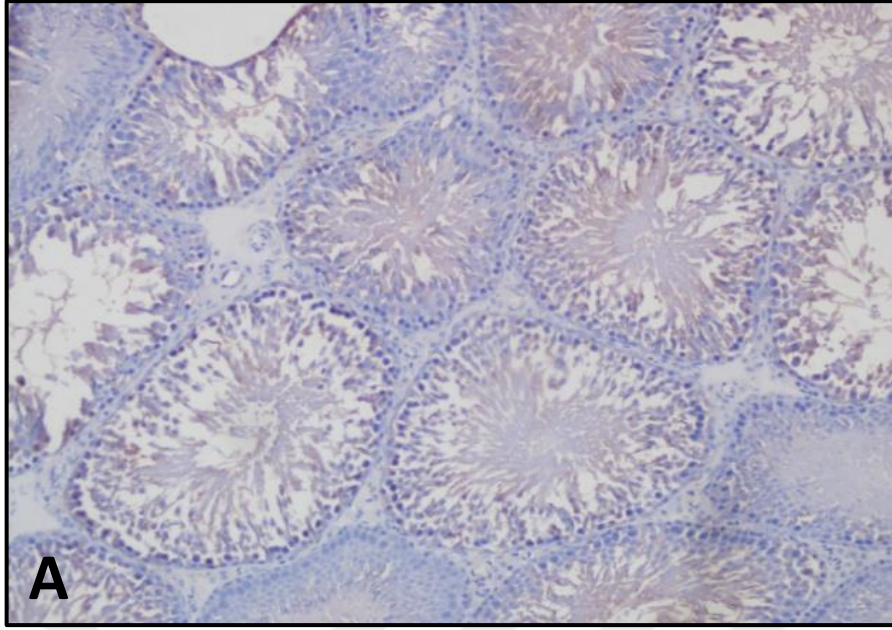
Şekil 3-25: Kontrol grubu VEGF immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

DM grubunda interstisyel alandaki hücrelerde ve özellikle damar çevresinde orta düzeyde (++) , leydig hücrelerinde oldukça güçlü (+++) VEGF ifadesi izlenmektedir. Spermatogenik seri hücrelerden spermatogonial hücreler boyunca orta düzeyde (++) , spermatoisitlerde ise güçlü (+++) ifade gözlenmektedir (Şekil 3-26).



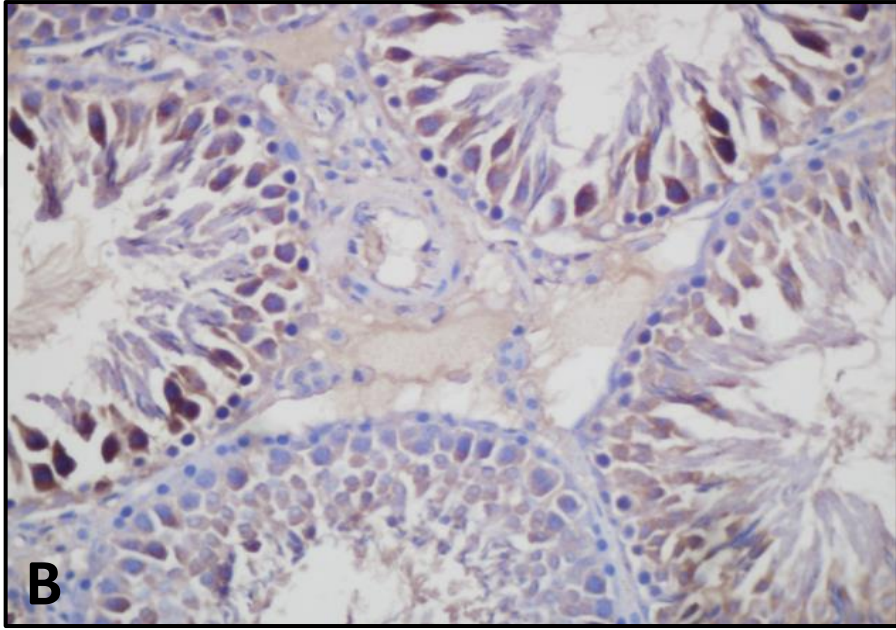
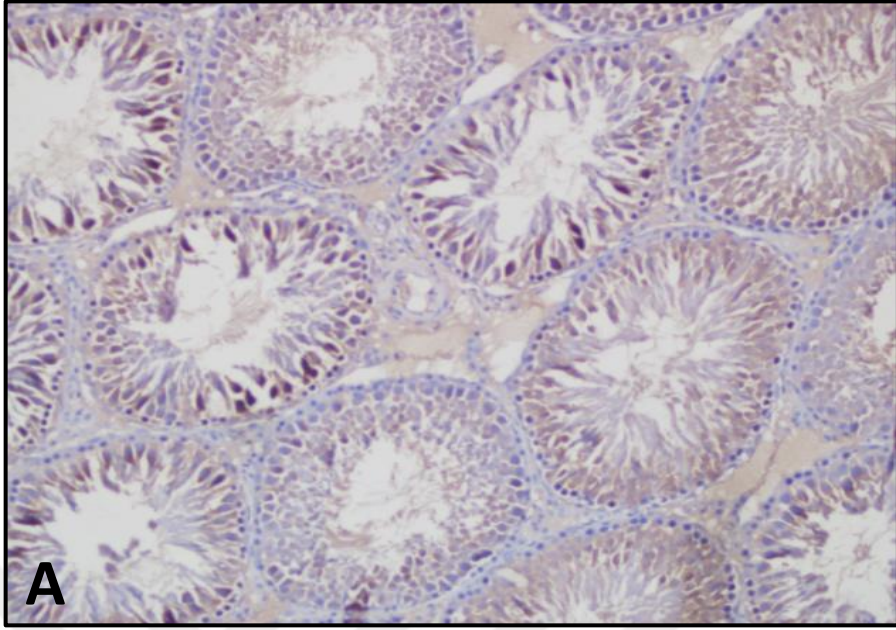
Şekil 3-26:DM grubu VEGF immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

AGO grubunda interstisyel alandaki hücreler ve leydig hücrelerinde ifade zayıftır (+), spermatogonial hücreler boyunca ve spermatositlerde ifade DM grubuna göre azalmıştır (+) (Şekli 3-27).



Şekil 3-27: AGO grubu VEGF immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

GAL grubunda interstisyel alanda ifade DM grubuna göre azalmıştır (++)
VEGF ifadesi spermatogonial hücreler boyunca orta düzeyde (++)
spermatozoidlerde ise güçlüdür (+++) (Şekli 3-28). Tüm gruplara ait immunoreaktif hücre yüzdesi ve ifadenme şiddetleri Tablo 3-9'da verilmiştir.



Şekil 3-28: GAL grubu VEGF immunoreaktivitesi (A, B), (Büyütme Ax20, Bx40).

Tablo 3-9: Testise ait kesitlerde seminifer tübül ve interstisyuma ait hücrelerdeki VEGF immunohistokimyasal immunoreaktivitesi (+) hücre sayısı yüzdeleri ile ifade şiddetleri (-: Boyanmamış; (+)1: Zayıf boyanmış; (+)2: Orta derecede boyanmış; (+)3: Güçlü boyanmış).

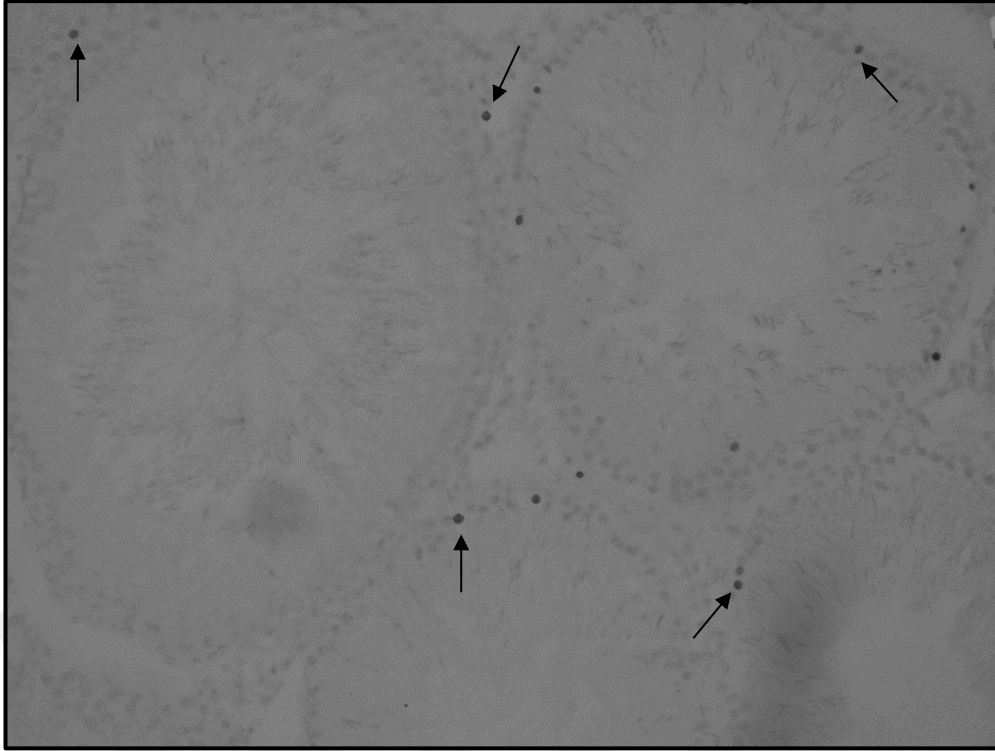
immuno reaktivite	Yaklaşık (~) % immunoreaktif (+) hücre yüzdesi ve ifadenme şiddetleri																							
	Spermatogonyum				Spermatosit				Spermatid				Sertoli				Leydig Hücreleri				İnterstitial Hücreler			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
VEGF	Kontrol	~% 2	~% 98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DM	-	~% 7	~% 87	~% 6	-	-	~% 3	~% 97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~% 10	~% 90	-	~% 2	~% 98
	AGO	~% 20	~% 80	-	-	~% 20	~% 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~% 30	~% 70	-	~% 91	~% 9	-
	GAL	-	~% 13	~% 87	-	-	-	~% 5	~% 95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~% 1	~% 10	~% 89	-	~% 80	~% 20

3.4 Tunel Bulguları

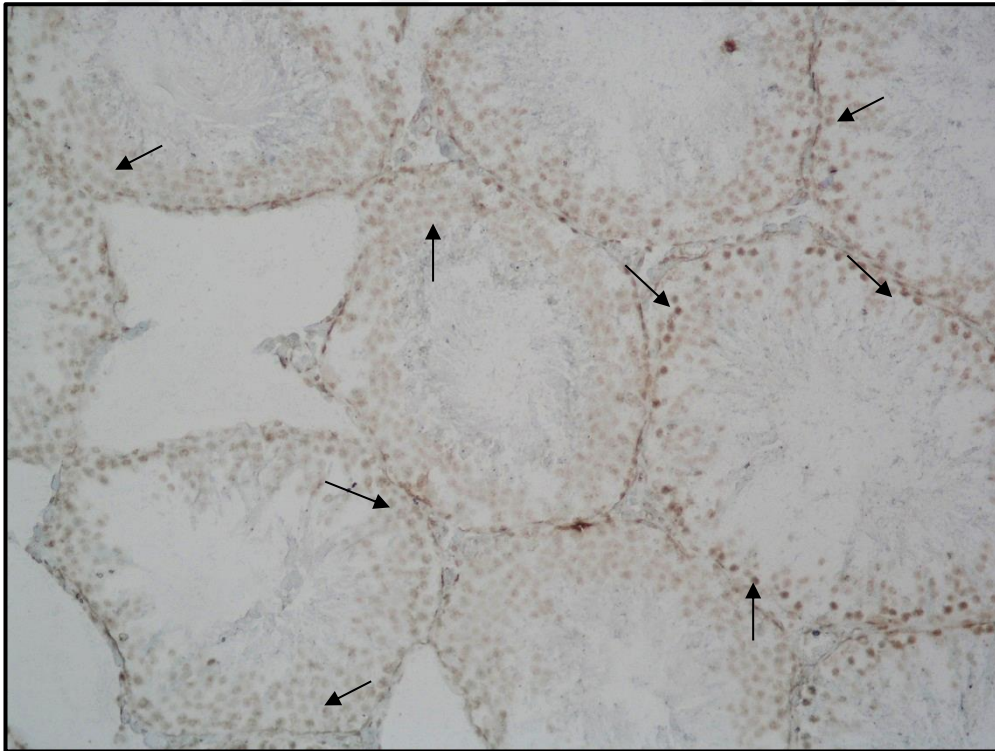
Apoptotik hücrelerin tespiti için uygulanan TUNEL boyamanın ışık mikroskopik incelenmesinde her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 tübülün hücreleri sayılmıştır. Gruplarda belirlenen TUNEL pozitiflikleri ve p değerleri Tablo 3-10'da, TUNEL pozitif hücre grafiğinde Şekli 3-35'de gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre TUNEL pozitifliği kontrol grubunda oldukça düşüktür (Şekil 3-29). Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda DM grubunda pozitif hücrelerde belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 3-30). AGO tedavi grubunda DM grubuna göre TUNEL pozitif hücre sayısının belirgin şekilde azaldığı ve kontrol grubuna yaklaştığı görülmektedir

(Şekil 3-31). GAL uygulanan grupta TUNEL pozitifliği DM grubuna benzerdir (Şekil 3-32). Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonuçlarına göre AGO grubunda pozitif hücre sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı iken GAL grubunda anlamlılık yoktur ($p < 0.05^*$ seviyesinde istatistiksel anlamlılık). Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmamıştır (Şekil 3-33). Pozitif kontrol için DNaz uygulanmış testis dokusu (Şekil 3-34) kullanılmıştır.

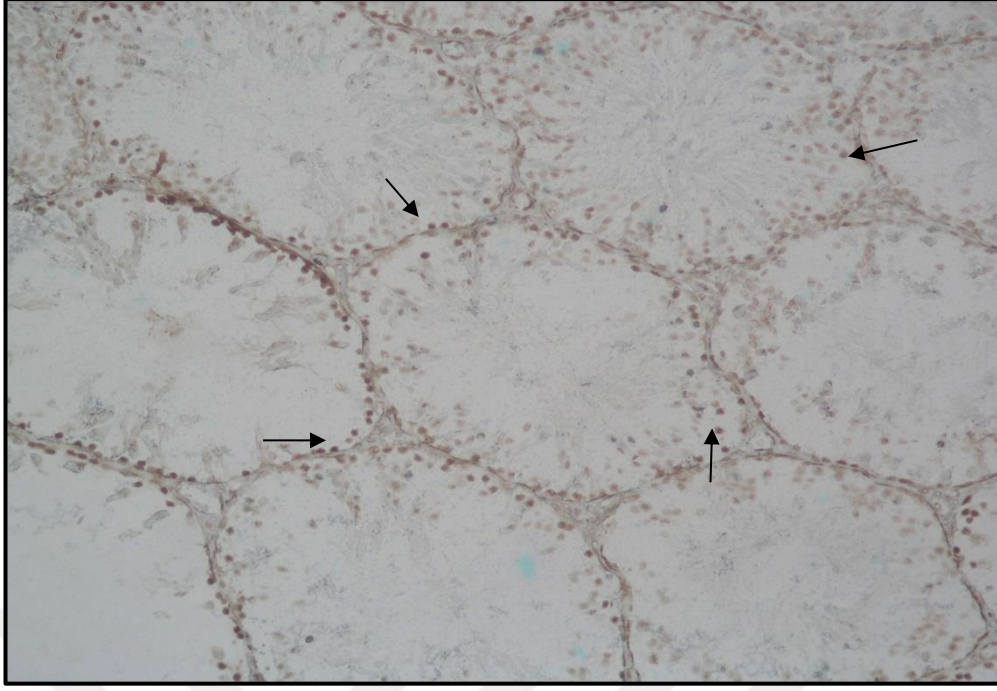




Şekil 3-29: Kontrol grubuna ait testis dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→), Tünel boyama, Büyütme x20.



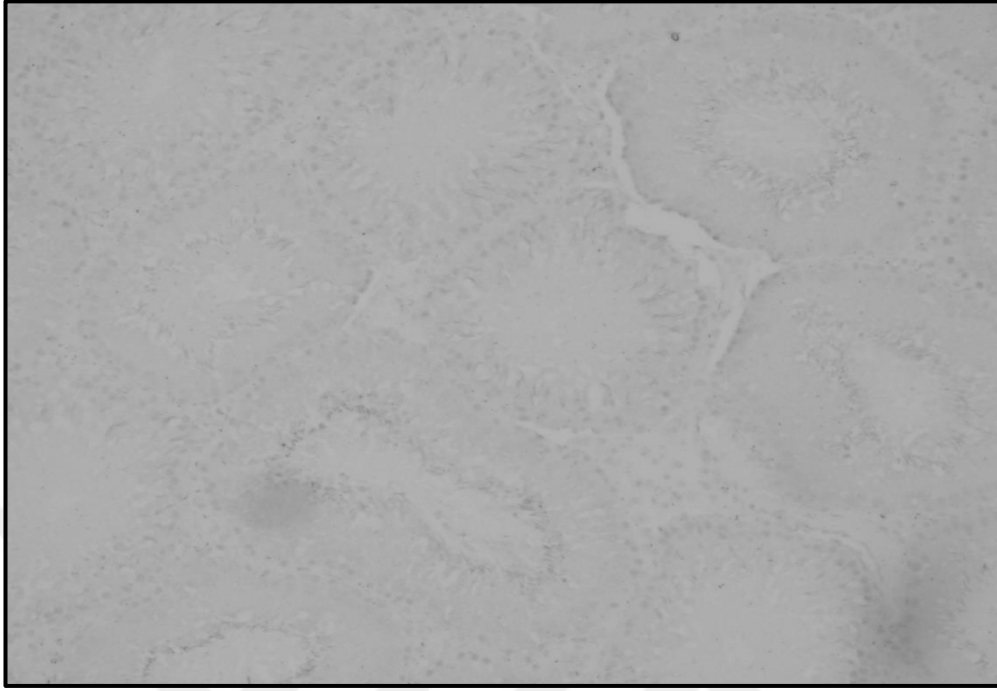
Şekil 3-30: DM grubuna ait testis dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→), Tünel boyama, Büyütme x20.



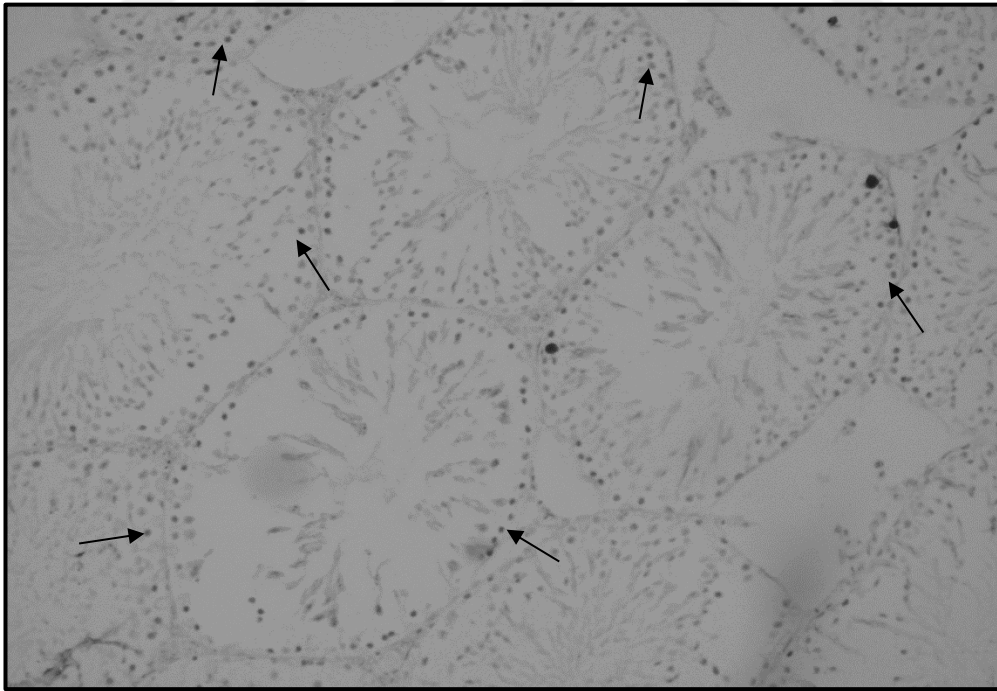
Şekil 3-31: AGO grubuna ait testis dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→), TUNEL boyama, Büyütme x20.



Şekil 3-32: GAL grubuna ait testis dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→), TUNEL boyama, Büyütme x20.



Şekil 3-33: Negatif kontrol TUNEL boyama, Büyütme x20.

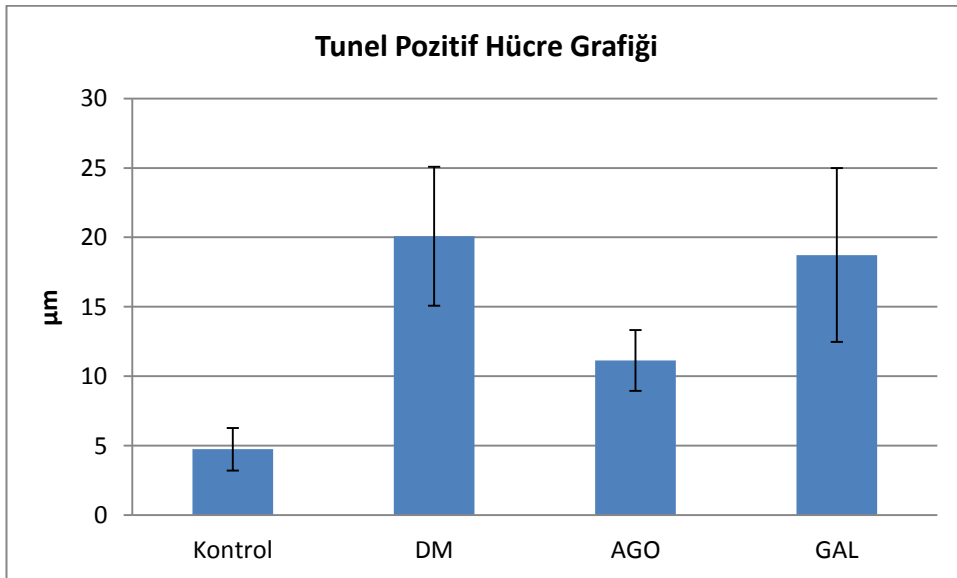


Şekil 3-34: DNaz uygulanmış testis dokusuna ait TUNEL pozitif hücreler (→), TUNEL boyama, Büyütme x20.

Tablo 3-10: TUNEL Boyama Skor Tablosu ve p değerleri, (*p<0.05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir).

TUNEL Boyama Skor Tablosu				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	4,20±0,44	12,10±0,39	12,00±0,51	23,30±0,80
2	6,00±0,13	24,00±0,32	11,30±0,24	12,70±0,42
3	3,40±0,37	20,40±0,21	14,00±0,64	15,80±0,68
4	7,00±0,18	13,70±0,40	8,00±0,48	19,60±0,45
5	6,10±0,89	19,90±0,43	9,70±0,44	21,30±0,54
6	4,10±0,52	24,30±0,58	14,00±0,43	9,20±0,67
7	2,40±1,43	26,20±0,13	9,00±0,45	29,20±0,41
Ortalama	4,74±0,56	20,08±0,35	11,14±0,45	18,72±0,56

Gruplar	P değeri
K-DM	0,000*
DM-AGO	0,000*
DM-GAL	0,342
AGO-GAL	0,007*



Şekil 3-35: Gruplara göre Tunel pozitif hücre dağılım grafiği.

3.5 Morfometrik Bulgular

3.5.1 Johnsen Testiküler Skoru

Johnsen testiküler skor değerlendirmesi her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 tübül incelenerek yapılmıştır. Skor değerlendirilmesi ve p değerleri Tablo 3-11'de verilmiştir. Kontrol, DM, AGO ve GAL grubu sıçan testis histolojik kesitleri değerlendirilerek ortalama skorları Tablo 3,6'da belirtilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonuçlarına göre AGO ve GAL grubundaki iyileşme istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05^*$ seviyesinde istatistiksel anlamlılık).

Tablo 3-11: Johnsen Testiküler Skor Dağılımları ve p değerleri ($*p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir).

Johnsen Testiküler Skor Tablosu				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	9,30±0,15	8,20±0,12	9,20±0,18	8,56±0,17
2	9,45±0,19	7,85±0,13	8,10±0,13	9,00±0,19
3	9,51±0,18	6,45±0,10	8,60±0,17	9,28±0,11
4	9,14±0,15	7,40±0,14	7,76±0,19	9,18±0,10
5	8,00±0,19	6,44±0,18	9,10±0,10	9,10±0,16
6	9,83±0,13	8,30±0,14	9,14±0,18	8,90±0,16
7	9,78±0,14	7,00±0,15	9,25±0,17	8,75±0,17
Ortalama	9,28±0,16	7,37±0,13	8,73±0,16	8,96±0,15

Gruplar	P değeri
K-DM	0,000*
DM-AGO	0,001*
DM-GAL	0,000*
AGO-GAL	0,182

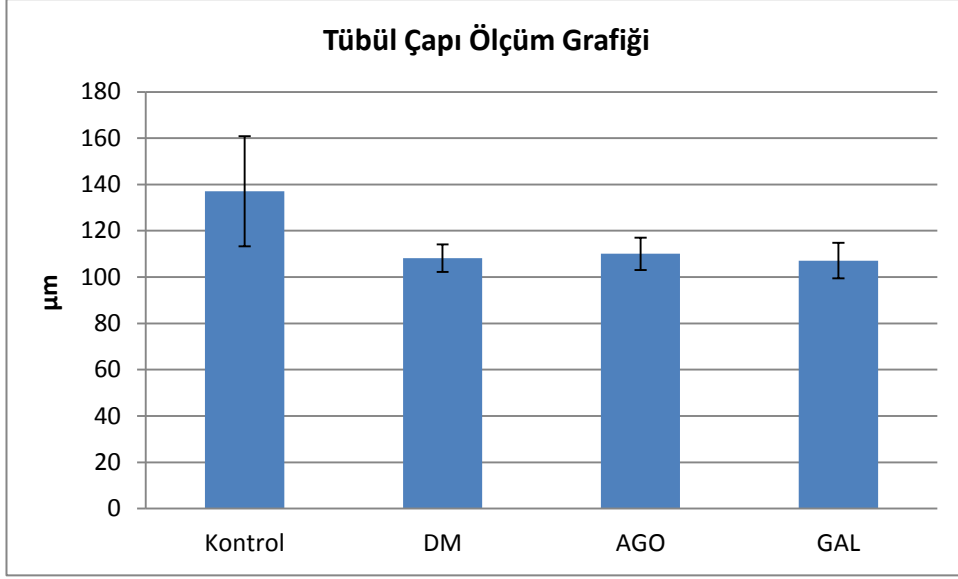
3.5.2 Tübül Çapı Ölçümü

Tübül çapı ölçümü her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 tübül çapı farklı düzlemlerde ölçülerek saptanmıştır. Kontrol, DM, AGO ve GAL grubu sıçan testis histolojik kesitleri değerlendirilerek ortalama skorları Tablo 3-12’de belirtilmiştir. Tübül çapı ölçüm grafiği ise Şekil 3-36’da gösterilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonuçlarına göre DM grubu ile AGO ve GAL grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.05^*$ seviyesinde istatistiksel anlamlılık).

Tablo 3-12: Tübül çaplarının karşılaştırılması ve p değerleri ($*p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir).

Tübül Çapı Ölçüm Tablosu (μm)				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	121,42 \pm 4,32	113,57 \pm 1,38	105,19 \pm 1,53	90,79 \pm 2,04
2	138,07 \pm 4,21	105,18 \pm 1,22	123,57 \pm 1,23	110,99 \pm 3,10
3	131,69 \pm 8,04	111,54 \pm 1,85	99,29 \pm 1,45	106,63 \pm 2,54
4	130,48 \pm 4,71	102,17 \pm 2,05	113,40 \pm 2,16	117,62 \pm 2,32
5	119,24 \pm 4,03	102,83 \pm 1,07	110,41 \pm 1,30	111,21 \pm 1,23
6	193,52 \pm 6,18	118,52 \pm 1,10	111,43 \pm 1,19	106,26 \pm 1,11
7	125,41 \pm 8,40	103,10 \pm 2,11	107,13 \pm 1,01	106,06 \pm 2,18
Ortalama	137,12\pm5,69	108,13\pm1,54	110,06\pm1,41	107,08\pm2,07

Gruplar	P değeri
K-DM	0,006*
DM-AGO	0,308
DM-GAL	0,397
AGO-GAL	0,247



Şekil 3-36: Tübül çapı ölçüm grafiği.

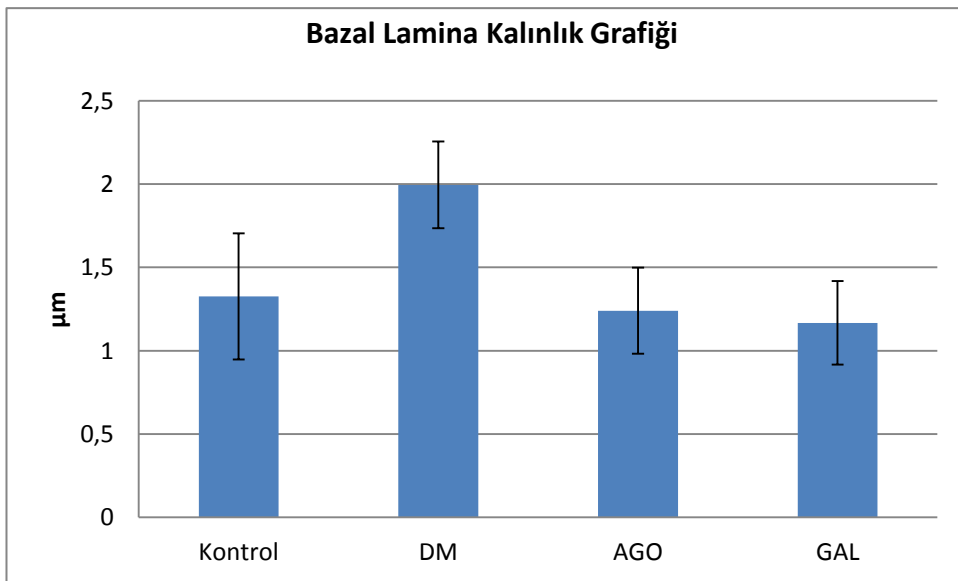
3.5.3 Bazal Lamina Kalınlık Ölçümü

Bazal lamina ölçümü her deney hayvanından 10 kesit, her kesitten rastgele seçilmiş 10 tübül incelenerek yapılmıştır. Kontrol, DM, AGO ve GAL grubu sıçan testis histolojik kesitleri değerlendirilerek ortalama skorları Tablo 3-13’de belirtilmiştir. Bazal lamina kalınlık grafiği ise Şekil 3-37’de gösterilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonuçlarına göre AGO ve GAL grubu ölçümleri DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$ * seviyesinde istatistiksel anlamlılık).

Tablo 3-13: Bazal lamina kalınlık karşılaştırılması ve p değerleri (*p<0.05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir).

Bazal Lamina Ölçüm Tablosu (μm)				
Hayvan Sayısı	Kontrol	DM	AGO	GAL
1	1,35 \pm 0,21	2,14 \pm 0,17	1,05 \pm 0,15	1,10 \pm 0,19
2	1,80 \pm 0,13	1,87 \pm 0,12	0,84 \pm 0,12	0,87 \pm 0,17
3	1,05 \pm 0,12	2,01 \pm 0,11	1,67 \pm 0,14	1,04 \pm 0,13
4	1,12 \pm 0,11	2,27 \pm 0,10	1,47 \pm 0,11	1,65 \pm 0,17
5	0,85 \pm 0,13	2,12 \pm 0,13	1,05 \pm 0,10	0,97 \pm 0,13
6	1,12 \pm 0,10	1,42 \pm 0,12	1,27 \pm 0,19	1,41 \pm 0,17
7	1,95 \pm 0,19	2,10 \pm 0,14	1,29 \pm 0,11	1,10 \pm 0,14
Ortalama	1,32\pm0,14	1,99\pm0,12	1,23\pm0,13	1,16\pm0,15

Gruplar	P değeri
K-DM	0,001*
DM-AGO	0,000*
DM-GAL	0,000*
AGO-GAL	0,316



Şekil 3-37: Bazal lamina kalınlık grafiği.

4. TARTIŞMA

Diabetes mellitus'un sebep olduğu komplikasyonlar arasında oksidatif stresin önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (10, 187). Son yıllarda yapılan araştırmalar birçok hastalığın temelinde oksidatif stresin yer aldığını göstermektedir (99, 188, 189). Protein glikasyonu, ilerlemiş glikozilasyon son ürünleri, glikoz oto-oksidasyonu ve aşırı superoksid üretiminin meydana getirdiği kombinasyon serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (10, 188). Serbest radikaller ile reaksiyona giren lipidler ağır hücre hasarı ile etki ettiği hücreyi ölüme götürecekt zararlar sebebt olmaktadır. Organizma serbest radikaller ile başa çıkabilmek için antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Diyabetli kişilerde bu mekanizma serbest radikallere doğru kayar ve zayıflar. Serbest radikal ve antioksidan dengesinin sağlanması için diyabette antidiyabetiklere ek olarak dış kaynaklı doğal antioksidanlar tedaviye takviye olarak verilmektedir (76, 77).

Reaktif oksijen türlerinin dışında diyabete bağımlı doku hasarları NO üretimi ilede ilişkilidir. Antioksidan ve nitrik oksit üretimini durduran kemotöropatiklerin STZ ile indüklenen hipergliseminin etkilerini azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (66, 190).

Spermatogenezin meydana geldiği testisin, oksidatif saldırılardan oldukça kolay etkilendiği bilinmektedir. Hücre bölünmelerinin oldukça yoğun olduğu bu organ zengin damarlanma göstermektedir. Yüksek düzeyde oksijen yayılımına sahip bu organda serbest radikal yüküde fazladır. Özellikle leydig hücrelerindeki testesteron üretiminin oksidatif stresten etkilendiği düşünölmektedir. Peroksidatif hasarın testiküler torsiyon, varikosel, diyabet, ksenobiyotik maruziyetinde testis disfonksiyonunun temel sebebi olduğu düşünölmektedir (191, 192, 193).

Bu bilgiler ışığında vaka sayısında her yıl oldukça yüksek oranlarda artış gösteren diyabetin erkek üreme organı olan testiste doku düzeyinde yaptığı hasarı agomelatin ve gallik asit antioksidan terapisi ile azaltmak hedeflenmiştir. Model olarak birçok literatürde temel alınan tek ve yüksek doz streptozotosin enjeksiyonu sıçan uygulaması kullanılmıştır (59, 60, 62). Endotel disfonksiyonuna sebep olan diyabetin etkilerinin kanlanması bol olan testis gibi organlarda belirlenmesi için

oldukça hassas parametreler gözlenmelidir (112). Yaptığımız çalışmada literatürlere uygun olarak; dokusal patolojinin yanı sıra MDA, KAT ve SOD gibi oksidan savunma mekanizmaları incelenmiştir. Kullanılan antioksidanların diyabet ile bozulan serbest radikal-antioksidan dengesini antioksidanlar lehine çevirmesi hedeflenmiştir.

Araştırmamızda oluşturulan streptozotosin ile indüklenmiş *diyabetik sıçan modeli testis histolojik incelemelerinde*; spermatogenik seri hücreler ile somatik sertoli hücrelerinde kayıp ve hücreler arası ayrışmalarla karakterize disorganizasyon saptanmıştır. Birçok tübülde lümene dökülmüş atipik hücreler görülmektedir. İntersitisyel alanda yoğun ödem ve düşük seviyede venöz hiperemi söz konusudur. *Agomelatin uygulanmış tedavi grubunda*; spermatogenik seri hücreler ile somatik sertoli hücrelerinde kayıp belirgin olarak azalmıştır. Lümende atipik hücre varlığı saptanmamıştır. Diyabetik dokularda komplikasyonel olarak görülen stromal fibrozis ve ödemin agomelatin uygulanması sonucu azaldığı saptanmıştır. *Diğer bir tedavi grubu olan gallik asit incelendiğinde*; diyabet grubunda spermatogenik seri hücreler ile somatik sertoli hücrelerinde görülen hücresel ayrılmalar ve kaybın, agomelatin grubuna benzer şekilde azaldığı görülmüştür. Fakat intersitisyel bağ dokudaki stromal fibrozis ve ödemin diyabet grubuna göre azalsada varlığını koruduğu tespit edilmiştir. Lümenlerde atipik hücre varlığı saptanmamıştır.

Gruplar arasında Tunel boyama sonuçlarına bakıldığında diyabet grubunda gözlenen tunel pozitif hücrelerin varlığının agomelatin grubunda kontrole yakın olarak anlamlı azaldığı gösterilmiştir. Gallik asit grubunda ise azalma görülmemektedir TUNEL profili diyabet grubuna yakındır. Morfometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler de söz konusu bulguları istatistiksel olarak desteklemektedir. Bulgularımız literatürlerde incelenen diğer çalışmalar ile uyumludur.

Literatürler incelendiğinde diyabetik sıçan modelleri ile kısa ve uzun süreli yapılan diyabet çalışmalarının birçoğunda diyabet grubunda spermatogenik hücre serileri ve sertoli hücrelerinde sayısal azalma, tübül dejenerasyonları ve intersitisyel ödem gözlenmiştir (113,194-197). Bizim çalışmamızda da literatür bulguları ile uyumlu sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Murray ve ark. nın (106), spontan diyabetli sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda seminifer tübüllerde atrofi gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada Anderson ve Thlivers'de aynı bulguya rastlamıştır (198). Bizim çalışmamızda da diyabet grubunda seminifer tübüllerde dejenerasyon ve tübüler atrofi gözlenmiştir.

Cameron ve ark. (197) diyabette oluşan testiküler dejenerasyonu testesteron azalmasına bağlamaktadır. İnsanlarda yapılan bu çalışmadaki bulgunun, interstisyel doku içindeki vasküler kalınlaşmaya bağlı leydig hücre dejenerasyonu sonucu ortaya çıktığını değerlendirmişlerdir. Anderson ve ark. (198) insülin verilmiş diyabetik sıçanlarda testesteron düzeyinin arttığını gözlemlemişlerdir. İnsülin LH, FSH üzerinden testesteron seviyelerini etkilemektedir (114, 199). Leydig hücrelerindeki hasarın STZ'nin toksik etkisinden oluşabileceği de düşünülmektedir. Murray ve ark. yaptıkları çalışma ile bu olasılığı elimine etmişlerdir. STZ kullanmadan spontan geliştirdikleri diyabet modelinde leydig hücrelerinde fonksiyon bozuklukları gözlemişlerdir (106). Bizim çalışmamızda damar kalınlaşması izlenmemiştir. Diyabetik sıçan testislerinde gözlediğimiz leydig hücre azalmasının oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Boric ve ark. (200) çalışmasında diyabetli sıçanların ağırlıkları 60 gün boyunca incelenmiş diyabet grubunda artış görülmezken, tedavi gruplarında artış gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da deney hayvanı ağırlıklarına bakıldığında diyabet grubu hayvanlarda deney sonunda ciddi kilo kaybı görülmüştür. AGO ve GAL grubunda azalmaya rastlanmamıştır. Khaneshi ve ark. (201) yaptığı çalışmada tedavi grubu testis ağırlıklarının kontrole yakın olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde diyabet grubu testis ağırlıklarında azalma gözlenmiştir.

İntersitisyel ödemin yaygın bir diyabet komplikasyonu olduğunu gösteren birçok araştırma bulunmaktadır (201, 202). Bizim çalışmamız da literatüre benzer şekilde intersitisyel ödem gözlenmiştir.

Dogan, yaptığı çalışmada diyabet grubunda lümende gözlediği spermatogenik seriye ait atipik hücreleri tedavi grubunda aminoguanidin antioksidanı ile etkili

şekilde azaltmıştır (203). Bizim çalışmamızda da diyabet grubunda gözlenen atipik hücrelere tedavi gruplarında rastlanmamıştır.

Ghafari ve ark. (204) diyabetik testis üzerine yaptıkları çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde seminifer tübül çaplarında önemli azalmalar gözlemiştir. Tedavi olarak hidroalkolik *Urtica dioica* ekstraktı uygulanan grupta ise tübül boyutunda normale dönüş izlenmemiştir. Bizim çalışmamızda dadiyabet grubunda ve tedavi grubu tübül çaplarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamızda PAS boyama sonuçlarına bakıldığında diyabet grubunda bazal lamina kalınlaşması görülmüştür. Cameron ve ark. (197) çalışmamıza benzer şekilde, diyabet hastası insanlarda seminifer tubül bazal lamina kalınlaşmasını belirlemiştir. Bazal lamina kalınlaşması ile tübüler beslenmenin bozulabileceğini öngörmekteyiz. Dolaylı olarak testesteron geçişinde azaldığı düşünülmektedir. AGO ve GAL grubunda ise bazal lamina kalınlığının normale benzer olduğu görülmektedir.

Literatürlerde testis dokusu üzerine antioksidan terapi denenilen birçok diyabet modelinde, çalışmamızda olduğu gibi olumlu sonuçların elde edildiği görülmektedir. Nasrolahi ve ark. yaptıkları çalışmada balın insülin seviyesini düzenleyerek LH ve FSH üzerinden testesteron salınımını arttırdığı ve oksidatif stresten doğan testis hasarını azalttığını göstermişlerdir (205). Kyathanahalli ve ark. *Withania somnifera* kök ekstraktının diyabetli testisteki disfonksiyonu onardığını belirtmişlerdir (206). Abbasi ve ark. susam yağının diyabette üreme parametrelerini geliştirdiğini göstermiştir (207). Benzer şekilde Li ve ark. nın (208) yaptığı çalışmada NADPH oksidaz inhibitörü olan aposiyaninin oksidatif stresi baskılayarak testiküler disfonksiyonu azalttığı gösterilmiştir.

Diyabet ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bölümünde histolojik incelemeler biyokimyasal bulgular ile desteklenmiştir. Singh ve ark. nın (209) hiperglisemik oksidatif stres üzerine yaptıkları çalışmalarında önemli reaktif oksijen süpürücüsü olan SOD ve KAT enzimlerinin diyabetle azalan varlığının tedavi grubunda arttığını göstermişlerdir. Tsounapi ve ark. nın (210) yaptığı edavaron ve taurinin terapötik gruplarda malondialdahit seviyesini önemli derecede azalttığını ve yalnızca edavaronun KAT aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdaki

biyokimya değerlendirmeler literatür ile uyumludur. Literatürlerin ve çalışmamızın gösterdiği bulgulara göre diyabet modellerinde antioksidanlar biyokimyasal parametrelerin düzenlenmesinde oldukça etkilidir.

Agomelatin ve diyabet ile ilgili yapılan tek çalışmada Karaikos ve ark. Tip II diyabetli hastaların depresyon tedavisinde agomelatin ve sertalini kullanmışlardır. Bu yeni nesil anti depresanın istatistikler sonucu oldukça kullanışlı olduğu saptanmıştır (211).

Yapılan alışmalar incelendiğinde STZ ile indüklenmiş diyabet modellerinde gallik asidin biyokimyasal olarak yaygın şekilde çalışıldığı görülmektedir. Fakat gallik asidin kullanıldığı histolojik çalışmalar oldukça azdır. Kade ve ark. nın yaptığı çalışmada STZ bağımlı pankreatik disfonksiyonun neden olduğu oksidatif strese gallik asidin etkisi incelenmiştir. Diyabetik sıçanlara 35 gün gallik asit uygulanmıştır. Çalışmada tedavi gruplarının MDA seviyelerinde azalma, antioksidan mekanizmalardan KAT enzim aktivitesinde ise artma olduğu gözlenmiştir (212). Vilapakkam ve ark. nın (213) yaptığı çalışmada bizim araştırmamıza benzer şekilde gallik asit 20 mg/kg 21 gün oral yolla uygulanmıştır. Tedavinin plazma insülin seviyesini anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Pankreatik lipid peroksidaz seviyesi azalmış, antioksidan enzimler ise artmıştır. Bulgular bizim çalışmamıza benzer şekilde oksidatif hasarın azaltıldığına işaret etmektedir. Çalışmamızda diyabet ile artan MDA seviyesinin AGO ve GAL gruplarında anlamlı olarak azaldığı, KAT ve SOD enzimlerinin ise arttığı görülmektedir. İki alışmada STZ kaynaklı pankreas beta hücre hasarının gallik asit tarafından onarıldığı düşünölmektedir (212, 214).

İmmünohistokimyasal belirteçlerde fibronektin, bazal lamina kalınlaşmasının yanı sıra interstisyel alanda fibroziside göstermektedir. Leroux-Stewart ve ark. nın yayınladıkları vaka raporunda diyabetik mastopatide yoğun fibrozis gözlenmiştir (215). Pala ve ark. ile Zeybek ve ark. nın çalışmasında STZ ile indüklenen diyabetik over ve endometrium çalışmasında stromada yoğun fibrozis izlenmiştir (216, 217). Günümüzde diyabetik sıçan modellerinde inflamatuvar ve glikasyonel gelişen stromal fibrozisdiyabetin en belirgin histopatolojik bulguları arasında yer alır. Ban ve ark. yaptıkları çalışmada diyabete bağlı fibrozisi “predominant ekstrasellöler matriks birikimi” olarak nitelendirmişlerdir. Aynı çalışmada bazal membran

kalınlaşmasında dikkat çekilmiştir. Skar dokusunun oluşumu ile beraber parankimal hücre kaybı ve neovaskülerizasyonda görülmektedir (218). Bizim çalışmamızda da diyabet grubu testislerde görülen fibrozis AGO uygulamasında azalmıştır. GAL grubunda ise fibrotik alanlarda azalma görülmemiştir.

Önemli sinyal moleküllerinden olan NOS2 immün cevabın oluşmasında görevlidir. NO üretimi ile inflamasyonu tetikler. Diyabette doku hasarının büyük bölümünün inflamasyon kaynaklı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle birçok diyabetik çalışmada NOS2 miktarındaki değişimler incelenmiştir (219, 220). Lue ve ark. nın (221) çalışmasında germ hücre sayısı ve testiküler boyutun belirlenmesinde NOS2'nin önemi gösterilmiştir. Çalışmanın diğer bir sonucuda NOS yokluğunun ısı ilişkili apoptozisi azalttığına gösterilmesidir. Köksal ve ark. nın (222) varikosel sıçan modellerinde yaptığı çalışmada leydig hücrelerinde NOS2 profillerinin önemi gösterilmiştir. Bryan ve ark. nın (223) yaptığı çalışmada sıçan testislerinde NOS2'nin inflamasyon kaynaklı testiküler disfonksiyona neden olduğu saptanmıştır. Yapılan birçok çalışmada diyabette artan oksidatif stresin NOS2 seviyelerinide etkilediği görülmektedir (224, 225). Diyabetin sebep olduğu yoğun inflamasyon, spermatogenik seri hücreleri ve makrofajlar dışında leydig hücrelerini de etkileyerek testesteron seviyesinde değişikliklere sebep olmaktadır. Böylece, inflamasyonun sebep olduğu direkt hasar dışında testesteron düşüşü de tübül dejenerasyonuna neden olmaktadır. Bizim çalışmamızdaki inflamasyon bulguları literatürleri desteklemektedir. Diyabet grubu testislerde görülen NOS2 artışı, tedavi gruplarında azalmıştır.

TNF α akut olarak sistemik inflamasyonu tetikleyen sitokinlerden bir diğeridir. En önemli rolü immün hücrelerin regülasyonunu sağlamaktır. TNF- α 'nın testiste spermatosit, pakiten spermatitler ve testiküler makrofajlardan üretildiği, Tip I TNF α reseptörlerinin sertoli ve leydig hücrelerinde bulunduğu görülmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin testis homeostazındaki önemli rolü bilinmektedir. TNF α geri beslemeli olarak NF-kB'yi aktive etmektedir. NOS2'ye benzer şekilde TNF α artışında testiküler disfonksiyon görülmektedir (226). Hutson'ın (227) yaptığı çalışmada testiküler makrofaj kültür ortamının leydig hücrelerine eklendiğinde testesteron seviyesinin etkilendiği gözlenmiştir. Bu etkinin TNF α kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın sonuçlarına dayanarak testiküler makrofajlar ve leydig

hücreleri arasındaki parakrin ifadenin TNF α ile sağlandığı hipotezi kurulmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada (228) TNF α nötralizasyonunun kas ve yağ dokusunda insülin duyarlılığını insülin reseptör tirozin kinaz üzerinden arttırdığını göstermiştir. TNF α 'nın obeziteye bağlı diyabette insülin rezistansını etkilediği düşünülmektedir. Çalışmamızda olduğu gibi inflamatuvar ve endokrin olarak diyabet ile TNF α ilişkisini inceleyen birçok çalışma vardır (229, 230). Bizim çalışmamızda da diyabet grubunda artan TNF α seviyeleri tedavi gruplarında azalmıştır.

Diyabette inflamasyonla birlikte vaskulogenez ve anjiyogenezin arttığı bilinmektedir. Bu artış birçok hücreden salgılanan VEGF tarafından sağlanmaktadır (231). Literatürlerdeki çalışmalar diyabet VEGF ilişkisinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Hagberg ve ark. (232) yaptıkları bir çalışmada diyabetik insülin direncinin önlenmesinde VEGF'yi hedef alan tedaviler önermektedirler. Boyer ve ark. (233) diyabetin en yaygın mikrovasküler komplikasyonlarından retinopati için anti-VEGF terapilerini önermektedir. Bott ve ark. nın (234) çalışmalarında VEGF reseptörleri seminifer tübül ve intersitisyel hücrelerin tamamında görülmektedir. Papparella ve ark.nın (235) çalışmasında VEGF immünoreaktivitesi bazal germinatif hat boyunca ve leydig hücrelerinde yoğun olarak görülmüştür. Cavalcante'nin (236) çalışmasında ise spermatogonial hattın dışında primer spermatozoidlerde de reaktivite görülmektedir. Sisman ve ark. (237) VEGF'yi diyabetik testiste hasarın gözlenmesi için potansiyel bir marker olarak önermişlerdir. VEGF'nin inflamasyon ve fibrozis dışında spermatogoniumların proliferasyonu ve hayatta kalması içinde arttığını gösteren çalışmalar da vardır (238). Bizim çalışmamızda da VEGF ifadesi literatürlerle uyumlu şekilde bazal germinatif hat boyunca ve leydig hücrelerinde yoğun olarak görülmüştür. Diyabet grubunda görülen VEGF artışının, AGO grubunda azaldığı, GAL grubunda ise azalmanın daha düşük oranlarda olduğu izlenmiştir.

Apoptosis patolojik durum göstermeksizin rutin spermatogenezde oldukça önemlidir. Diyabet gibi fizyolojik olmayan birçok stres durumunda germ hücrelerinde apoptosis görüldüğü bilinmektedir. Diyabette organ hasarlarında inflamasyonun yönettiği apoptoz hücrelerde sıklıkla görülmektedir (240, 241). İnflamasyon dışında apoptozis sebeplerinden bir diğeri reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hasardır. Özellikle karaciğer ve böbrek gibi organ hasarlarında apoptoz

görülen bölgeler akut olarak fibrozise gitmektedir (242). Pollanen ve ark. nın (243) yaptığı çalışmada diyabetik farelerde germ hücrelerinde görülen apoptozis artışının testis disfonksiyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Koh (244) çalışmasında STZ ile indüklenen diyabetik sıçan modellerinde apoptozis artışının JNK fosforilasyonu ve Bax aktivasyonu ile olduğunu vurgulamaktadır. Bax, mitokondri zar permeabilizasyonu ile sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkmasını sağlayarak kaspaz kaskadını uyarmaktadır. Wang ve ark. nın (245) çalışmasında diyabette testiküler hücrelerdeki artmış apoptozun primer sebebinin oksidatif stres olduğu ve sulforaphane'in Nrf2 (nükleer faktör 2) yolağı üzerinden antioksidan üretimini arttırarak testisi apoptozdan koruduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda da Agomelatin tedavi grubunda apoptoz profilinde anlamlı bir azalma görülmektedir. Bu azalmanın agomelatinin antiinflamatuvar ve antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. GAL grubunda ise apoptotik hücrelerde azalma görülmemiştir.

Yapılan çalışmalar ve bilimsel araştırmalar Diyabette artmış şekerin non-enzimatik glikasyona sebep olduğunu göstermektedir. Glikasyon sonucu dokularda proteinlerin ve lipidlerin glikozillenmesi ile ileri glikasyon son ürünlerinin (Advanced glycation end-product, AGEs) birikimi görülmektedir. Bu ürünler sellüler ve subsellüler düzeyde etki göstermektedir. Ayrıca plazmada ve organ stromasında da AGE oluşumu bilinmektedir. Stromadaki fibronektin glikasyonu, şekerin karbonil grubu ile proteinin serbest amino grubunun Schiff bazı oluşturmasıyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içinde Amadori ürünlerini (Karamelizasyon ürünleri) oluşturmaktadır. Amadori ürünleri ileriki aşamalarda dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde AGE'lere dönüşmektedir. Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar geri dönüşümlü etki gözlenirken, sonraki evreler geri dönüşümsüzdür. Glikasyon, konsantrasyona bağımlıdır bu sebeple diyabette yapımının arttığı görülmektedir (246, 247).

AGE'ler organizmada bulunan RAGE reseptörlerine bağlanmaktadır. AGE'lerin RAGE'ye bağlanması immün cevapta önemli rollere sahip olan NF-kB genini aktive eder. Birçok inflamatuvar sitokinlerin ortak yolağı olan NF-kB aktivasyonu ise şiddetli inflamasyonu tetiklemektedir. Diyabette AGE, bakteri lipopolisakkaritleri (LPS) gibi

algılanarak inflamasyonu tetikleyen bir bakteri rolü oynamaktadır. İmmün sistem LPS ve AGE ayrımını yapamamaktadır. NF-kB aktivasyonu TGF'i tetikler, TGF aktivasyonu ise fibroblastları tetikleyerek fibrozisi başlatır ve VEGF, IL1 gibi sitokinlerin seviyesini artırır. İnflamasyona bağlı stromal kalınlaşma yoğun doku artışından doğan oksijen ihtiyacını anjiyogenez ile destekler. RAGE-bağımlı VEGF artışı da anjiyogeneze stromal iskelet oluşturmak için geri beslemeli şekilde fibrozisi arttırmaktadır. AGE'nin inflamasyon yolları üzerinden fibrozisi dolaylı tetiklemesinin dışında stromaya direkt AGE çökmesiyle de fibrozis tetiklenmektedir. Makrofajlar tarafından temizlenemeyen birikim dokuyu fibrozis ile onarıma itmektir. Stromada yoğun kollajen artışı gözlenmektedir. AGE stroma dışında kapiller bölgeye çökerek kapiller beslenmesini bozmakta (mikrovaskulopati) ve hipoksik ortam oluşturmaktadır. Hipoksi, HIF (hypoxy-inducible factor) üzerinden inflamasyona sebep olmaktadır. HIF aktivasyonu, AGE'nin inflamasyona bağlı fibrozisi tetiklediği üçüncü yol olarak düşünülebilir. Fakat bu yol da NF-kB'ye bağlıdır (247-250).

Reaktif oksijen türlerinin mevcutiyyetinde de NF-kB aktive olmaktadır. Bir diğer NF-kB aktivatörü TNF α sitokinidir. İmmün reaksiyonlarda aktif makrofajlar, nötrofil ve eozinofillerden üretilen TNF α , NF-kB aktivasyonunu dolaylı olarak da inflamasyonun devamlılığını sağlar (251).

NF-kB üzerinden aktive olan bir diğer proinflamatuvar sitokin NOS2'dir. Yüksek miktarda NO üreterek immün cevabı yönetir. Ayrıca, diyabette NOS2'nin oksidatif stresin belirlenmesinde bir marker rolü oynadığı bilinmektedir (252).

AGE, RAGE dışında, Pattern Recognition Receptor (PRR) ailesinden olan Toll Like Reseptors (TLRs)'lere bağlanarak benzer şekilde inflamasyonu tetikler. TLR'ler vücutta mikroorganizmaları tanıyarak immün sistemin aktivasyonunu sağlamakla görevlidir. Bu reseptörler p50 üzerinden NF-kB aktivasyonunu sağlar (251).

Çalışmamızda oksidatif stresin ve histopatolojik hasarın tedavisinde Agomelatin ve Gallik asit kullanımı amaçlanmıştır. Agomelatin (Valdoksan®) MT1 ve MT2 (Melatonerjik) reseptör agonisti, 5-HT2C (Serotonin reseptör) antagonistidir.

Pineal bezden salgılanan melatoninin en güçlü doğal antioksidanlardan olduğu bilinmektedir. Melatonin, transkripsiyon ve translasyon düzeyinde NF-kB'yi inhibe etmektedir. NF-kB'nin inhibisyonu o kadar etkilidir ki direkt inhibisyonu dışında bağlanacağı reseptörlerde inhibe edilir. NF-kB üzerinden dolaylı olarak TGF ve TNF α da inhibe olur. Aynı zamanda melatonin, MT1/MT2 reseptörleri üzerinden mitotik aktiviteyi yavaşlatarak hücrenin onarım süresini uzatır ve apoptozu baskılar. Melatoninin hücre tamirinde görevli genlerin ifadesinde artış sağladığı da bilinmektedir. Agomelatin-Melatoninin bu özelliklerine ek olarak- serotoninin reseptör (5-HT2C) blokörü olarak farklı bir etkiye sahiptir. Serotoninin fibroblastlar üzerindeki reseptörlere bağlanarak fibrozisi arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca melatonin antioksidan savunmada görevli moleküllerin üretildiği genleride aktive etmektedir(253). Çalışmamızda agomelatinin serotoninin salınımını inhibe ederek stromal fibrozisi azalttığını düşünmekteyiz.

Diyabet epigenetik mekanizmalar üzerinde de etkilidir. Şeker düzeyinin artması ile RAGE bağımlı olarak histon modülasyonu görülmektedir. Kullanılan tedaviler şeker düzeyini normale döndürse de epigenetik mekanizmaların katkısı ile organizma uzun bir süre şeker düzeyi yüksekmiş gibi davranış gösterir. Bu olguda uzun süreli inflamasyona sebep olur. Melatonin gen ve protein düzeyinde sağladığı etkiyi epigenetik olarak da göstermektedir. Melatonin bir kez uygulandığında etki uzun süreli olarak devam eder. Bu özelliğinden dolayı çalışmamızda görüldüğü gibi agomelatin diyabetin epigenetik etkilerinin tedavisinde seçilmiş bir moleküldür. Ayrıca, melatonin immün sistemin tamponu olarak görev yapmaktadır. İnflamatuar sitokinlerin seviyeleri yükseldiğinde veya azaldığında onları normal düzeye çektiği bilinmektedir. İnflamatuar sitokinler ile azalan interlökinler, TNF α ve NOS2 seviyelerini azaltmaktadır. Böylece antioksidan enzim (SOD, KAT) seviyelerinde artış gözlenirken lipid peroksidasyonu ise azalmaktadır (253).

Gallik asit gibi polifenol bileşiklerinin bilinen en belirgin etkileri anti inflammatuar ve antioksidan ajan olmalarıdır. En bilinen antioksidan etkiside 2, 2'-azinobis-(3-etil-benzothiazolin-6-sülfonik asit radikallerini süpürmesidir. Gösterikleri bu etkiler ile inflammatuar sitokinlerin ve oksidatif stresin azalmasına sebep olurlar.

Diyabetik dokularda apoptoz mekanizmaları incelendiğinde ekstrinsik ve intrinsik mekanizmaların birlikte etki gösterdiği görülmektedir. Mitokondride aşırı laktat oluşumu ve reaktif oksijen türevlerinin birikimi görülmektedir. Bu birikimler zar permeabilizasyonunu arttırmaktadır. Sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkışı ile intrinsik yol üzerinden (kaspaz 9) apoptozis görülmektedir. Diyabette artan TNF α miktarıda ekstrinsik yol üzerinden (kaspaz 8) apoptozisi başlatmaktadır. TNF α , Fas ligandına bağlanarak kaspaz 8 üzerinden hücreyi ölüme sürüklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda agomelatinin apoptoz indeksini azalttığını düşünmekteyiz. Bunun sebebinin melatoninin antiinflamatuvar olarak TNF α 'yı azaltarak ekstrinsik yoldan apoptotik inhibisyon sağlaması ve sitokrom C'nin mitokondri zarı dışarısına çıkmasını sağlayan Bax ifadesini ve ROS miktarını azaltarak intrinsik baskılama sağlaması olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca melatoninin p53'ü direkt olarak inhibe ettiği de bilinmektedir. Çalışmamızda da apoptotik profillerde beklenen bulguların elde edildiği görülmektedir (253, 254).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde de diğer dünya ülkelerinde olduğu gibi Diabetes mellitus' un insidansı gün geçtikçe artmaktadır. Çok uzun yıllar öncesinden beri bilinen ve toplumda görülme sıklığı giderek artan bu metabolik hastalık başta kardiyovasküler sistem olmak üzere birçok organda çeşitli patolojiler göstermektedir. Diyabetli hastalarda ve deneysel diyabetik hayvan modellerinde ciddi testis hasarına sebep olduğu bilinmektedir. Diyabetik komplikasyonlara yol açan sebeplerden en önemlisinin reaktif oksijen kaynaklı oksidatif stres olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada da diyabet kaynaklı oksidatif stresin sebep olduğu testis hasarı agomelatin ve gallik asit tedavileri ile azaltılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda diyabetik sıçan testislerinde tübüler atrofi, spermatogenik seri hücrelerinde dağınıklar, lümene dökülmüş atipik hücreler ve stromal fibrozis belirlenmiştir. Agomelatin tedavi grubunda testis hasarı biyokimyasal ve histolojik olarak önemli ölçüde hafiflemiştir. Bulgular inflamasyonun ve inflamasyon kaynaklı fibrozisin azaldığını işaret etmektedir.

Serbest radikal süpürücü olan Gallik asit ise biyokimyasal olarak etkili fakat histopatolojik olarak düşük etkiye sahiptir. Bunun sebebinin gallik asidin bozunma süresinin kısalığı veya gavaj yolu ile mideye verildiğinde tam olarak emilmemesi olduğu düşünülmektedir. Yapılacak diğer çalışmalarda gallik asidin dozunun veya enjeksiyon sıklığının arttırılması veya i.p. olarak uygulanması önerilmektedir.

Agomelatin türevli antidepresanlar ticari preparat şeklinde bulunmasına rağmen gallik asit formülize edilmemiştir. Gelecekte farklı dozajların hayvan deneylerinde test edilmesi ile birlikte gallik asidin antioksidan preparatlar arasında yerini alabileceği öngörülmektedir.

Agomelatin ve Gallik asidin erkek üreme sistemi üzerine etkisinin tam olarak saptanması için ileriki çalışmalarda sperm parametreleri ve testesteron seviyelerinin incelenmesi önerilmektedir. Her iki kimyasalında diyabet kaynaklı komplikasyonların giderilmesinde kullanılması için ileri düzey çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular incelendiğinde, Agomelatin ve Gallik asidin diyabet kaynaklı testis hasarının sebep olduğu infertiliteyi azaltarak üreme sağlığını korumaya yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca agomelatin ve gallik asidin diyabetik testis üzerine etkisini histolojik ve biyokimyasal olarak inceleyen ilk çalışma olan bu tez özgünlüğü ile literatüre katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Satman İ, İmamoğlu Ş, Yılmaz C. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Ankara: Bayt Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın Şti. 2009.
2. Von Mering, Minkowski. Arch F Exp Path u Pharmakol 1889; XXVI: 271.
3. Tuncer S. Deneysel Tıp I Diyabetin Sıçan Periferik Sinirleri Üzerine Etkisinin Numerik Analiz Yöntemleri ile İncelenmesi. Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 2008.
4. Diyabet Cemiyeti Web site [homepage on the Internet]. Türk Diyabet Cemiyeti, 2014 [cited 2014 august 20]. Available from: <http://www.diabetcemiyeti.org/c/diyabet-istatistikleri>.
5. Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. Hematologia 2000;30:91-96,
6. Engin A, Altan N, Işık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. Drugs R D 2005;6:35-40,
7. Agardh CD, Stenram U, Torffvitt O, Agardh E. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. J Diabetes Complications 2002;16:395-400).
8. Armağan, A, Uz E, Yılmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Özçelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. Asian J Androl 2006;8:595-600.
9. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: Free radical reactions and modification of biomolecules. Molec Aspects Med 1998;19:221-357.
10. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Turk J Biochem 2006;31:51-56.
11. Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. Curr Diabetes Rev 2008;4:46-54.
12. Van Acker S, Van-den Berg D, Tromp M, Griffioen D, van Bennekom W, Van der Vijgh W, Bast A. Structural aspects of antioxidants activity of flavonoids. Free Radic Biol Med 1996;20:331-342,

13. Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Centa A, Creczinsky-Pasa TB. Antioxidant, Antitumoral and Anti-Inflammatory Activities of Gallic Acid. In book: Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications, Edition: 4 th, Chapter: Antioxidant, Antitumoral and Anti-Inflammatory Activities of Gallic Acid, Publisher: NovaPublishers Ed: Thompson MA, Collins PB. 2014:1-23.
14. Uzbay İT. Agomelatin: Genel Bilgiler, Farmakolojisi ve Kullanım Güvenliği. Klinik Psikiyatri 2012;15:9-19
15. Li XJ, Zhang LM, Gu J, Zhang AZ, Sun FY. Melatonin decreases production of hydroxyl radical during cerebral ischemia-reperfusion. Zhongguo Yao Li Xue Bao 1997;18:394-6.
16. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. Biochem Biophys Res Commun 1998;253:614-20,
17. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. Free Radic Biol Med 2000;29:1177-85.
18. American Diabetes Association Web site [homepage on the Internet]. Diabetes Basics, 2013 [cited 2013 May 22]. Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/>
19. Altuntaş Y. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2001:51-62.
20. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations 2001. Diabetes Care 2001;1:133.
21. Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı. Ed: H İlkova. Diabetes Mellitus, Net Matbaacılık, İstanbul 1997: 9-18.
22. UDK Diyabet tanı ve tedavi rehberi. Türkiye diyabet vakfı 3. Baskı Nisan 2013.
23. Kahn R, Weir C, King L, Jacobson M, Moses C, Smith J. Joslin's Diabetes Mellitus. İstanbul Medical Yayıncılık Ltd. Şti. İstanbul 2008;333-348,
24. Poretzky L. Principles of Diabetes Mellitus. London: Springer 2010.
25. Scobie IN. Atlas of Diabetes Mellitus (3th ed.). Informa UK Ltd. UK 2007;1-14, 63-69.

26. Turok DK, Ratcliffe SD, Baxley AG. Management of gestational diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 2003;68:1769-72.
27. Dornhorst A, Paterson CM, Nicholls JS, Wadsworth J, Chiu DC, Elkeles RS et. al. High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. *Diabet Med* 1992;9:820-825.
28. Marquette GP, Klein VR, Niebyl JR. Efficacy of screening for gestational diabetes. *Am J Perinatol* 1985;2:7-9.
29. 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* 2004;27:1047-53.
30. Narayan K, Boyle J, Thompson T, Sorensen S, Williamson D. Lifetime risk for diabetes mellitus in the united states. *JAMA* 2003;290:1884-1890.
31. Satman I. TURDEP-II Ön Sonuçlar. *Diabetologia* 2000;43:433.
32. Myers AR. Endokrin ve Metabolik Hastalıklar-NMS İç Hastalıkları (3.Baskı). Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 1998;449-92.
33. Robert N Frank. On the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Opht* 1991;98:586-593.
34. Klein R, Klein B. Epidemiyology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes care* 1992;15:1875-91.
35. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, Turner RC, Holman RR, Manley SE et. al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 2001;44:156-163.
36. Ballone E, Colagrande V, Di Nicola M, Di Mascio R, Di Mascio C, Capani F. Probabilistic approach to developing nephropathy in diabetic patients with retinopathy. *Stat Med* 2003;22:3889-3897.
37. Dere F. *Anatomi cilt:2* 1989;677- 702.
38. Moore KL, Persaud TVN. Klinik yönleriyle İnsan Embriyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri 2009;173-283.
39. Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet* 2006;7:620-31.
40. Kierszenbaum AL. *Histoloji Ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık. 2006;499-584.
41. Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji*: Palme Yayıncılık;2005:375-376.
42. Burgu B, Telli O. Testiküler Embriyoloji ve Testiküler İniş Mekanizmalarına Dair Hipotezler. *Turk Urol Sem* 2010;1:47-51.

43. Husmann DA, Levy JB. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995;46:267-76.
44. Ovalle WK, Nahrney PC. *Netter Temel Histoloji: Güneş Tıp Kitabevleri* 2009;228-229.
45. Ross MH, Pawlina W. *Histology with correlated cell and molecular biology.* Lippincott Williams& Wilkins 2006;700-704.
46. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji: Nobel Tıp Kitabevleri*, 10 baskı. 2006.
47. Stevens A, Lowe J. *Human Histology.* Jaypee Brothers Publishers 2011.
48. Kuehnel W. *Color Atlas of Cytology. Histology and Microscopic Anatomy*, 2003.
49. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji: Nobel Tıp Kitabevleri*,11 baskı 2007;931-1008.
50. Pearl SE, *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş.* Akademik Basın ve Yayıncılık, İstanbul 2008.
51. Gartner LP, Hiatt JL. *Renkli Histoloji Atlası (4. Baskı).* Güneş Tıp Kitabevleri Ankara 2009;369-382.
52. Kalaycı Ş. *Histoloji, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa* 1986.
53. Kayaalp O. *Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler.* Hacettepe TAŞ Ankara 2001.
54. Alarcon-Aquilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Gonzales-Paredes B, Contreras Weber CC, Roman-Ramos R. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, an one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol* 2000;69:207-15.
55. Pari L, Umamaheswari J. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Phytother Res* 2000;14:136-8.
56. Koopmans SJ, Mroz Z, Dekker R, Corbijn H, Ackermans M, Sauerwein H. Association of insulin resistance with hyperglycemia in streptozotocin-diabetic pigs: effects of metformin at isoenergetic feeding in a type 2-like diabetic pig model. *Metabolism* 2006;55:960-71.
57. Ciechanowski K, Kedzierska K, Golembiewska E, Miklaszewicz A, Domanski L, Bober J et. al. The influence of oxidative stress on permeability of capillary vessels in the cheek pouch of hamsters with alloxan-induced diabetes. *Vasa* 2004;33:211-4.
58. Van de Maele I, Rogier N, Daminet S. Retrospective study of owners' perception on home monitoring of blood glucose in diabetic dogs and cats. *Can Vet J* 2005;46:718-23.

59. Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol* 1944;103:233-43,
60. Pushparaj P, Tan CH, Tan BKH. Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2000;72:69-76.
61. Kohnert KD, Axcróna UM, Hehmke B, Klötting I, Sundler F, Ahren B. Islet neuronal abnormalities associated with impaired insulin secretion in type 2 diabetes in the Chinese hamster. *Regul Pept* 1999;82:71-9.
62. Ejrnaes M, Von Errath MG, Christen U. Cure of chronic viral infection and virus-induced type 1 diabetes by neutralizing antibodies. *Clin Dev Immunol* 2006;13:67-77.
63. Aldrich Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment. Germany 2003-2004;46.
64. Jaouhari JT, Lazrek HB, Jana M. The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *J Ethnopharmacol* 2000;69:17-20.
65. Arora S, Ojha SK, Vohora D. Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice. *Global Journal of Pharmacology* 2009;3:81-84.
66. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
67. Ganda OP, Rossi AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 1976;25:595-603.
68. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 1974;23:889-95.
69. Stefan Y, Malaisse-Lagae F, Yoon JW, Notkins AL, Orci L. Virus-induced diabetes in mice: a quantitative evaluation of islet cell population by immunofluorescence technique. *Diabetologia* 1978;15:395-401.
70. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969;48:2129-39.
71. Hofstaezer V, Carpenter AM. Comparison of streptozotocin and alloxan-induced diabetes in the rat, including volumetric quantitation of the pancreatic islets. *Diabetologia* 1973; 9:178-84.
72. Agarwal MK. Streptozotocin: mechanisms of action: proceedings of a workshop held on 21 June 1980, Washington DC. *FEBS Lett* 1980;120:1-3.

73. Johansson EB, Tjalve H. Studies on the tissue-disposition and fate of [14C] streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1978;89:339-51.
74. Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 1982;257:6084-8.
75. Kar İ, Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda alfa lipoik asidin testis dokularına etkisinin histolojik yönden incelenmesi, Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 2010.
76. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev* 2004;25:612-628.
77. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke *Free Radic Biol Med* 2005;39:841 -852.
78. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri (1.baskı). Mimoza Yayınları Konya 1995.
79. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine Third Edition* Oxford Science Publications 2001;22-24.
80. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
81. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44.
82. Memişoğulları R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Funct* 2003;21:291-296.
83. Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2004;18:193-197.
84. Ostenson CG. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 241-247.
85. Lipinski, B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2001;15: 203-210.
86. Pratic`o D. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis* 2005;181:215-224.

87. Memişoğulları R. Plazma Homosistein Düzeyleri ile Tip II Diyabet, Komplikasyonları, Kontrolü ve Süresi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi 2003.
88. Onat T, Emerk K, Sözmén EY. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık Ankara 2002,
89. Taysi S, Polat F, Gül M, Sari RA, Bakan E . Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2002;21:200-204.
90. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1341-1348.
91. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820,
92. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004;53:110-118.
93. Altan N, Yiğit Ő, Elmalı E, Malhatun E, Rota S, Kılıç N. Effects of the Sulfonylurea Gliburide on Superoxide Dismutase in Streptozotocine-Induced Diabetic Rat Muscle. *Gen Pharmacol* 1997;28:795-96.
94. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 1988;14:1114-1120.
95. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 2002;51:1360-1362.
96. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T et. al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997;46:1481-1490.
97. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;97:1422-1428.
98. Way KJ, Katai N, King GL, Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 18:945-959.
99. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
100. Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular dysfunction in diabetic rats: potential contribution of autooxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. *J Clin Invest* 1995;96:1159-1163.

101. Cameron NE, Cotter MA. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997;46:31-37.
102. Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF. Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1987;316:599-606,
103. Greene DA, Sima AAF, Alberts JW, Pfeifer MA. Diabetic neuropathy. In *Diabetes Mellitus Theory and Practice* (4th ed) Eds: Rifkin H, Porte D. Elsevier New York, NY 1990.
104. Bukan N, Sancak B, Bilgihan A, Kosova F, Buğdaycı G, Altan N. The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Method Find Exp Clin* 2004;26:519-22,
105. Karasu Ç, Öztürk Y, Altan N, Yıldızoğlu N, İkizler C, Altan VM. Thyroid Hormones Mediated Effect Of Insulin On Alloxan Diabetic Rat Atria. *Gen Pharmacol* 1990;21:735-740.
106. Murray FT, Cameron DF, Orth JM. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism* 1983;32:141-147.
107. Calvo JC, Baranao JL, Tesone M, Charreau EH. Hypothalamic hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. *J Steroid Biochem* 1984;20:769-772.
108. Aitken RJ. The Amoroso Lecture: The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115:1-7.
109. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001;8:851-862.
110. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:316-331.
111. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943;138:512-518,
112. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008;40:354-360.
113. Öztürk F, Ağkadir M, Yağmurca U. Deneysel Diyabetin Sıçan Testislerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. *T Klin J Med Sci* 2002;22:173-178.

114. Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res* 2000;28:342-347.
115. Çavdar C, Sifil A, Çamsar T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Journal of the Turkish Nephrology* 1997;3-4:92-95.
116. De Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaer E, Renald P, Munoz C, Millian MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nature Rev Drug Discov* 2010;9:628-642.
117. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005;9:11-24.
118. Danielczyk K, Dziegiel P. Receptory melatoninowe oraz ich rola w onkostatycznym działaniu melatoniny, *Postepy Hig Med Dosw* 2009;63:425-434.
119. Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 19-39.
120. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008;85:335-353.
121. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 2005;27: 119-130.
122. Suzen S. Recent developments of melatonin related antioxidant compounds. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2006; 9:409-419.
123. Girish MB, Bhuvana K, Nagesh Raju G, Sarala N. A novel atypical antidepressant drug: agomelatine - a review. *Int J Pharm Biomed Res* 2010;1:113-116.
124. Zupancic M, Guilleminault C. Agomelatine - a preliminary review of a new antidepressant. *CNS Drugs* 2006;20:981-992.
125. Tinant B, Declercq JP, Pupaert JH, Yous S, Lesieur D. N-[2-(7-Methoxy-1-aphthyl)ethyl]acetamide, a potent melatonin analog. *Acta Cryst*, 1994;50:907-910.
126. Roshdy HM, Kassem SM. Cytogenetic and Embryotoxic Effects of Valdoxan® (Agomelatine) on Female Mice and Their Embryos, *World Journal of Medical Sciences* 2013;9:136-141.
127. Srinivasan S, Zakaria R, Othman Z, Lauterbach EC, Acuña-Castroviejo D. Agomelatine in Depressive Disorders: Its Novel Mechanisms of Action. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2012;24:290-308.

128. Aguiar CC, Almeida AB, Araujo PV, Vasconcelos GS, Chaves EM, do Vale OC, Macedo DS, de Sousa FC, Viana GS, Vasconcelos SM. Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. *Epilepsy Behav* 2012;24:324-328.
129. Banach M, Gurdziel E, Jedrych M, Borowicz KK. Melatonin in experimental seizures and epilepsy. *Pharmacol Rep* 2011;63:1-11.
130. Uberos J, Augustin-Morales MC, Molina CA, Florido J, Narbona E, Munoz-Hoyos A. Normalization of the sleep-wake pattern and melatonin and 6-sulphatoxy-melatonin levels after a therapeutic trial with melatonin in children with severe epilepsy. *J Pineal Res* 2011;50:192-196.
131. Manikandan S. Agomelatine: A novel melatonergic antidepressant, *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1: 122-123.
132. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94:311-321.
133. Kobayashia H, Oikawaa S, Hirakawab K, Kawanishia S. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutat Res* 2004;558:111-120.
134. Scheele CW. Om Sal essentielle Gallarum eller Gallåple-salt" (On the essential salt of galls or gall-salt). *Kongliga Vetenskaps Academiens nya Handlingar* 1786;7:30-34.
135. Henri B. Observations sur la préparation et la purification de l'acide gallique, et sur l'existence d'un acide nouveau dans la noix de galle" [Observations on the preparation and purification of gallic acid, and on the existence of a new acid in galls]. *Annales de chimie et de physique* 1818;9:181-184.
136. Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ et. al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *J Nat Prod* 2003;66:983- 6.
137. Patel SS, Goyal RK. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. *Pharmacognosy Res* 2011;3:239-45.
138. Punithavathi VR, Prince PS, Kumar MR, Selvakumari CJ. Protective effects of gallic acid on hepatic lipid peroxide metabolism, glycoprotein components and lipids in -induced type II diabetic Wistar Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2011;25:68-76.

139. Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J Agric Food Chem* 2006;54:7539-7543.
140. Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:898-904.
141. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep* 1994;11:41-66.
142. Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 2001; 131:1207-1210.
143. Ziegler, IM, Billes F. Vibrational Spectroscopic Calculations on Pyrogallol and Gallic Acid, *Journal of Molecular Structure*, 2002;618:259-265.
144. Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction *Anim Reprod Sci* 2001;65:1-16.
145. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:9265-9269.
146. Hayashi Y, Abe M, Murai A, Shimizu N, Okamoto I, Katsuragi T. Comparison of effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on plasma nitrite/nitrate levels and tissue NOS activity in septic organs. *Microbiol Immunol* 2005;49:139-47.
147. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, GÖZÜKARA EM. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'in Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Turkiye Klinikleri J Pediatr* 2001;10:226-35,
148. Tatsumi N, Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology*. 1997;138:994-998.
149. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
150. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-259.
151. Vaux DL, Haeccker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;76:777-779.
152. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı yada yokluğu bir hastalık nedeni: Klinik fizyopatoloji, *Klinik Gelişim* 2009;22:20-25.

153. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. Sendrom 2001;13:102-7.
154. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*. 1994; 30:2068-73.
155. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
156. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW et. al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
157. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001;26:390-7.
158. Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci* 2001;26:61-6.
159. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604.
160. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004;52:821-831.
161. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219
162. Erol N. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Anti-VEGF Ajanlar Vascular Endothelial Growth Factor and Anti VEGF Agents, *Ret-Vit* 2007;15:35-40.
163. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
164. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol* 2006;142:660-668.
165. Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006;90:1542-1547.
166. Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006;83:473-483
167. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H et. al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:182-189.

168. Shams N, Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin N Am* 2006;19:335-344.
169. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 2002;115:3861-3.
170. Hynes, Richard O. *Fibronectins*. Berlin: Springer-VerlagI. 1990.
171. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010;68:930-941.
172. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
173. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 2010;67:446-457.
174. Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, Saermark T. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:37-43.
175. Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Identification of genes that function in the TNF α -mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol* 2002;20:376-80.
176. Englaro W, Bahadoran P, Bertolotto C, Busca R, Derijard B, Livolsi A et. al. Tumor necrosis factor α -mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor κ B activation. *Oncogene* 1999;25:1553-9.
177. Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* 2003;8:222-237.
178. Coupland RE. Observations on the Normal Histology and Histochemistry of the Fat Body of the Locust (*Schistocerca Gregaria*). *J Exp Biol* 1957;34:290-296.
179. Çakalağaoğlu F, Tissue processing, *Aegean Pathology Journal* 2005;29-34.
180. Ekicioğlu G, Özkan N, Şalvaazar E. Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E), *Aegean Pathology Journal* 2005;2:58-61.
181. Hotchkiss RD. A microchemical reaction resulting in the standing of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch Bioch* 1948;16:131.
182. Marsha Goldstein, Simon Watkins. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Mol Biol* 2008;81:14.6.1-14.6.23.

183. Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1:2-25.
184. Sun Y, Oberley L, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
185. Demougeot C, Marie C, Beley A: Importance of iron location in iron-induced hydroxyl radical production by brain slices. *Life Sci* 2000;67:399-410.
186. Abei H. Catalase in *Methods in Enzymatic analysis* (Bergmeyer HU,Ed) Verlag Chemie Weinheim 1974;673-678.
187. Kakkar R, Mantha, SV Jasim Radhi J, Kailash Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes *Clin Sci (Lond)* 199;94:623-632.
188. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107:1058-70.
189. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *journal of Biomarkers* 2013;8.
190. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:1458-64.
191. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005;40:728-736.
192. Banfi B, Molnar G, Maturana A et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001;276:37594-37601.
193. Chubb C, Desjardins C. Vasculature of the mouse, rat, and rabbit testis-epididymis. *Am J Anat* 1982;165:357-72.
194. Jain GC, Jangir RN. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. *Pharmacogn Rev* 2014;8:113-21.
195. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 2014;10:147-57.
196. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 1997;49:508-13.

197. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec* 1985;213:53-62.
198. Anderson JE, Thliveris JA. Testicular histology in streptozotocin induced diabetes. *Anat Rec* 1986;214:378-82.
199. Kowluru RA, Kowluru A, Chakrabarti S, Khan Z. Potential Contributory Role of H-Ras, a Small G-Protein, in the Development of Retinopathy in Diabetic Rats *Diabetes* 2004;53:775-783.
200. Boric M, Kadic AJ, Puljak L. The expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the dorsal horns of rats with type 1 and type 2 diabetes. *Neurosci Lett* 2014;579:151-156.
201. Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi S, Nejati V. Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed* 2013;3:347-355.
202. Maggie M. Ramzy, Azza A. K. El-Sheikh, Maha Y. Kamel, Soha A. Abdelwahab, and Mohamed A. Morsy, Mechanism of testicular protection of carvedilol in streptozotocin-induced diabetic rats, *Indian J Pharmacol.* 2014 Mar-Apr; 46(2): 161-165.
203. Orman D. Diyabetin sıçan testislerinde neden olduğu histolojik değişiklikler üzerine aminoguanidin'in etkilerinin araştırılması. İnönü üniversitesi Tıp fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Malatya 2010.
204. Ghafari S, Balajadeh BK, Golalipour MJ. Effect of *urtica dioica* L. (Urticaceae) on testicular tissue in STZ-induced diabetic rats. *Pak. J.Biol. Sci* 2011; 14(16):798-804.
205. Nasrolahi O, Khaneshi F, Rahmani F, Razi M *Iran J Reprod Med.*, Honey and metformin ameliorated diabetes-induced damages in testes of rat; correlation with hormonal changes. 2013 Dec;11(12):1013-20.
206. Kyathanahalli CN, Manjunath MJ, Muralidhara. Oral supplementation of standardized extract of *Withania somnifera* protects against diabetes-induced testicular oxidative impairments in prepubertal rats. *Protoplasma* 2014;251:1021-1029,
207. Abbasi Z, Tabatabaei SR, Mazaheri Y, Barati F, Morovvati H. Effects of sesame oil on the reproductive parameters of diabetes mellitus-induced male rats *World J Mens Health* 2013;31:141-9.

208. Li M, Liu Z, Zhuan L, Wang T, Guo S, Wang S, Liu J, Ye Z. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Mol Med Rep* 2013;7:47-52.
209. Singh R, Bhardwaj P, Sharma P. Antioxidant and toxicological evaluation of Cassia sopherain streptozotocin-induced diabetic Wistar. *Pharmacognosy Res* 2013;5:225-232.
210. Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Koukos S, Shimizu S, Satoh K, Takenaka A, Sofikitis N. Antioxidant treatment with edaravone or taurine ameliorates diabetes-induced testicular dysfunction in the rat. *Mol Cell Biochem* 2012;369:195-204.
211. Karaiskos D, Tzavellas E, Ilias I, Liappas I, Paparrigopoulos T. Agomelatine and sertraline for the treatment of depression in type 2 diabetes mellitus *Int J Clin Pract* 2013;67:257-60.
212. Kade IJ, Ogunbolude Y, Kamdem JP, Rocha JBT. Influence of gallic acid on oxidative stress-linked, streptozotocin-induced pancreatic dysfunction in diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2013;26:1-11.
213. Punithavathi VR, Prince PSM, Kumar R, Selvakumari J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats, *Eur J Pharmacol* 2011;650:465-471.
214. Latha RC, Daisy P. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interac* 2011;189:112-118.
215. Leroux-Stewart J, Rabasa-Lhoret R. Diabetic Mastopathy: Case Report and Summary of Literature. *Can J Diabetes*. 2014;1499:2671(13)01474-3.
216. Pala HG, Pala EE, Artunc Ulkumen B, Aktug H, Yavasoglu A, Korkmaz HA, et. al. The Protective Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Endometrium and Ovary in a Rat Model of Diabetes Mellitus. *Gynecol Obstet Invest* 2014.
217. Zeybek B, Ergenoglu M, Erbas O, Yildirim N, Akdemir A, Yavasoglu A, Aktug H, Taskiran D. High-dose atorvastatin ameliorates the uterine microenvironment in streptozotocin-induced diabetic rats, *Gynecol Endocrinol*. 2014;3:1-5.
218. Ban CR, Twigg SM. Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4:575-96.
219. Foster JM, Carmines PK, Pollock JS. Diabetes-induced NOS1 and NOS2 activity blunts oxygen consumption in renal medullary thick ascending limbs. *ASEB* 2010;24.

220. Heltianu C, Guja C. Heltianu and Guja, Role of Nitric Oxide Synthase Family in Diabetic Neuropathy. *J Diabetes Metab* 2011;5.
221. Lue Y, Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice, *Endocrinology* 2003;144:3092-100.
222. Türker Köksal I, Erdoğan T, Gülkesen H, Sezer C, Usta M, Ciftçioğlu A, Baykara M. The potential role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in the testicular dysfunction associated with varicocele: an experimental study, *Int Urol Nephrol* 2004;36:67-72.
223. O'Bryan MK, Schlatt S, Gerdprasert O, Phillips DJ, De Kretser DM, Hedger MP. Inducible Nitric Oxide Synthase in The Rat Testis: Evidence For Potential Role In Both Normal Function And Inflammation-Mediated Infertility. *Biol Reprod* 200;63:1285-1293.
224. Park MH, Heo SJ, Park PJ, Moon SH, Sung SH, Jeon BT, Lee SH. 6,6'-Bieckol Isolated from *Ecklonia cava* Protects Oxidative Stress Through Inhibiting Expression of ROS and Proinflammatory Enzymes in High-Glucose-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2014.
225. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F. Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus. *Biomed Res Int* 2014.
226. Lysiak JL. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis, *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:9.
227. Hutson JC. Secretion of tumor necrosis factor alpha by testicular macrophages. *J Reprod Immunol* 1993;23:63-72.
228. Hotamisligil GS, Bruce M, Spiegelman BM. Tumor Necrosis Factor α : A Key Component of the Obesity-Diabetes Link, *Diabetes* 1994;43:1271-1278, 1939-327.
229. Lee LF, Xu B, Michie SA, Beilhack GF, Warganich T, Turley S et. al. The role of TNF α in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: Analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:15995-16000.
230. Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus, *Indian J Med Res* 2012;127-130.

231. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B et. al. Increased Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor VEGFR-2 in Experimental Diabetes Diabetes 48:2229.
232. Hagberg CE, Mehlem A, Falkevall A, Muhl L, Fam BC, Ortsäter Het et.al. Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes, Nature 2012;490:426-430.
233. Boyer DS, Hopkins JJ, Sorof J, Ehrlich JS. Anti-vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Diabetic Macular Edema. Ther Adv in Endo and Metab 2013;4:151-169.
234. Bott RC, McFee RM, Clopton DT, Toombs C, Cupp AS. Vascular endothelial growth factor and kinase domain region receptor are involved in both seminiferous cord formation and vascular development during testis morphogenesis in the rat. Biol Reprod 2006;75:56-67.
235. Papparella A, Nino F, Noviello C, Romano M, Papparella S, Paciello O, Sinisi AA, 2013, Morphologic changes due to human chorionic gonadotropin in the rat testis: Role of vascular endothelial growth factor. Open Journal of Pediatrics 2013:3.
236. Cavalcante FS, Aiceles V, Moraes Dde F, Alves-Pereira JL, Faria TS, Ramos Cda F. The testis of the mice C57/BL6 offspring in adulthood have alterations due to maternal caffeine consumption. Acta Cir Bras 2014:29.
237. Sisman A, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, Aksu I, Guvendi G, Uysal N. Potential Novel Biomarkers for Diabetic Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Nerve Growth Factor Beta and Vascular Endothelial Growth Factor, Dis Markers 2014;108106.
238. Caires KC, De Avila J, McLean DJ. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. Reproduction 2009;138:667–677.
239. Leea SC, Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007;39:497-504.
240. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced Inflammation and Apoptosis-Impact on Periodontal Pathology, J Dent Res January 2006;85:15-21.
241. Ryan A, Murphy M, Godson C, Hickey FB. Diabetes mellitus and apoptosis: inflammatory cells, Apoptosis 2009;14:1435-1450.

242. Krijnen PAJ, Simsek S, Niessen HWM. Apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 2009;14:1387-1388.
243. Sainio-Pollanen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O, Pollanen P. Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int J Androl* 1997;20:243-253.
244. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *J Vet Med Sci.* 2007;69:969-71.
245. Wang Y , Zhang Z , Guo W, Sun W , Miao X, Wu H et. al. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the up-regulation of Nrf2 expression and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;1:307.
246. Parmaksız İ. Advanced Glycation End-Products in Complications of Diabetes Mellitus. *Gaziantep Medical Park, Biyokimya*, 2011;24:141-148.
247. Jing YH, Chen KH, Yang SH, Kuo PC, Chen JK. Resveratrol ameliorates vasculopathy in STZ-induced diabetic rats: role of AGE–RAGE signalling. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:212-222.
248. Kiriakidis S, Andreacos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF- κ B-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF- κ B inhibitor I κ B α and a kinase defective form of the I κ B kinase 2. *J Cell Sci* 2003;116:665-674.
249. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Jaehyun Im et. al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *J Transl Med.* 2009;7:17.
250. Zhu P, Ren M, Yang C, Hu YX, Jian-Min Ran JM, YanL. Involvement of RAGE, MAPK and NF- κ B pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes, *Exp Dermatol* 2012;21:123-129.
251. Lee J, Sayed N, Hunter A, Au KF, Wong WH, Mocarski ES et. al. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* 2012;151:547-58.
252. Sousa MM, Du Yan S, Fernandes R, Guimaraes A, Stern D, Saraiva MJ. Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *Neurosci* 2001;21:7576-86.
253. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero M. Melatonin: Buffering the Immune System. *Int J Mol Sci* 2013;14:8638-8683.

254. Korkmaz A, Rosales-Corral S, Reiter RJ. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. *Gene* 2012;503:1-11.



ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Cumhuriyet'te doğdum. 2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığım lisans eğitimimi Eylül 2010 tarihinde tamamladım. Ardından Eylül 2010'da Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yaptım ve 2012 yılında çalışmalarımı tamamladım. 2012 Eylülün'de aynı anabilim dalında başladığım Doktora çalışmalarına halen devam etmekteyim. Aynı zamanda 2013 şubat ayında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında Araştırma görevlisi olarak yüksek lisans eğitimi almaktayım.