



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇÖREK OTU YAĞI, METFORMİN VE VİTAMİN-E' NİN DENEYSEL
DİYABETİK RATLARDA FERTİLİTE POTANSİYELİ, TESTİKÜLER
VE SPERMATOLOJİK KARAKTER ÜZERİNDEKİ KORUYUCU
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Seval KAYA

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

DİYARBAKIR

2021



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇÖREK OTU YAĞI, METFORMİN VE VİTAMİN-E' NİN DENEYSEL
DİYABETİK RATLARDA FERTİLİTE POTANSİYELİ, TESTİKÜLER
VE SPERMATOLOJİK KARAKTER ÜZERİNDEKİ KORUYUCU
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Seval KAYA

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

DİYARBAKIR

2021

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı
tarafından TIP.19.018 Numaralı proje ile desteklenmiştir.



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** doktora öğrencisi **Seval KAYA**'nın hazırladığı “**Çörek Otu Yağı, Metformin ve Vitamin-E'nin Deneysel Diyabetik Ratlarda Fertilite Potansiyeli, Testiküler ve Spermatolojik Karakter Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :/....../2021

Danışman: **Prof. Dr. Yusuf Nergiz**
Jüri üyeleri

İmza

Jüri başkanı
Üye
Üye
Üye
Üye

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../.../ve...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

... /.../...

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

06/05/2021

Seval KAYA

İmza

TEŞEKKÜR

Tez Çalışmamın konusunun belirlenmesi, çalışılması ve sonuçlandırılması sürecinde bilgi ve birikimleri ile bana yol gösteren sayın danışman hocam Prof. Dr. Yusuf NERGİZ'e, Değerli bilgi ve birikimleriyle eğitim sürecimde bana yol gösteren ve her zaman yanımda olan değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Engin DEVECİ'ye,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Murat AKKUŞ'a, Prof. Dr. Sevda SÖKER'e, Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ'a, Doç. Dr. Selçuk TUNİK'e, Doç. Dr. Cenap EKİNCİ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÖKALP ÖZKORKMAZ'a,

Tez izleme komisyonunda yer alarak katkılarını esirgemeyen Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi, Prof. Dr. Orhan TACAR hocama, Tezimin Spermatolojik verilerinin analizinde katkı sağlayan Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ferit ÖZMEN'e

Doktora tezimin çalışılması ve sonuçlandırılmasında sürecinde katkı sağlayan Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Uğur ŞEKER'e,

Her zaman yanımda olduğunu hissettiğim arkadaşım doktora öğrencisi Gamze ERDOĞAN'a,

Tez çalışma sürecimde desteklerini sunan bölümümüz yüksek lisans mezunu Hayat AYAZ ve bölümümüz araştırma Görevlisi Fırat AŞIR'a,

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olup desteklerini hissettiren Sevgili Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca **TIP.19.018** numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
1 ÖZET	1
1.1 TÜRKÇE ÖZET	1
1.2 ABSTRACT	3
2 GİRİŞ ve AMAÇ	5
3 GENEL BİLGİLER.....	8
3.1 Testis.....	8
3.1.1 Testis anatomisi.....	8
3.1.2 Testis embriyolojisi	10
3.1.3 Testis fizyolojisi	12
3.1.4 Testis histolojisi.....	15
3.2 Erkek İnfertilitesi.....	26
3.3 Diyabet.....	29
3.3.1 Tarihçesi	29
3.3.2 Tanımı	29
3.3.3 Sınıflandırılması	30

3.3.4	Streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturma.....	31
3.3.5	Diyabet ve erkek infertilite ilişkisi.....	33
3.4	Çörek otu yağı	34
3.4.1	Çörek otu yağı'nın genel özellikleri.....	34
3.4.2	Çörek otu yağı ve anti-diyabet ilişkisi	35
3.4.3	Çörek otu yağı ve erkek fertilite ilişkisi.....	36
3.5	Metformin.....	36
3.5.1	Metformin'nin genel özellikleri	36
3.5.2	Metformin ve erkek fertilite ilişkisi	38
3.6	Vitamin E	39
3.6.1	Vitamin E'nin genel özellikleri.....	39
3.6.2	Vitamin E ve anti- diyabet ilişkisi.....	41
3.6.3	Vitamin E ve erkek fertilite ilişkisi	42
3.7	Apoptozis.....	43
3.8	PCNA (Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni)	47
4	GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
4.1	Deney Hayvanlarının Temini	48
4.2	Deneyin Tasarlanması	48
4.3	Diyabetin Oluşturulması.....	50
4.4	İlaç Dozlarının Uygulanması.....	51
4.5	Histolojik Doku Takibi.....	51
4.6	Histokimyasal metodlar.....	51
4.6.1	Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	51
4.6.2	Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü	52

4.6.3	Van Gieson Boyama Protokolü.....	52
4.7	İmmunohistokimyasal Metodlar ve TUNEL Assay	53
4.7.1	PCNA immunohistokimyası	53
4.7.2	Caspase-3 immunohistokimyası.....	54
4.7.3	TUNEL Assay	55
4.8	Epididimal Spermatolojik Analizler	56
4.8.1	Epididimal sperm konsantrasyonunun değerlendirilmesi	57
4.8.2	Epididimal spermin motilite yönünden incelenmesi	58
4.8.3	Epididimal spermde vitalite oranı ve morfolojik değerlendirilme	58
4.9	Morfometrik ve İstatistiksel Analiz	59
5	BULGULAR.....	64
5.1	Morfometrik Bulgular.....	64
5.1.1	Deney öncesi ve sonu vücut ağırlık ve kan şeker düzeyleri sonuçları	64
5.1.2	Testis, Seminal vezikül, Prostat ve Epididimis ağırlık sonuçları	66
5.1.3	Johnsen biyopsi skor analizi sonuçları	67
5.1.4	Seminifer tubül çapı sonuçları.....	68
5.1.5	Tunica Albuginea ve Germinal Epitel kalınlıkları sonuçları	70
5.1.6	Bazal membran kalınlık sonuçları.....	71
5.2	Spermatolojik Bulgular.....	71
5.2.1	Motilite, Konsantrasyon ve Vitalite sonuçları.....	71
5.2.2	Epididimal sperm baş, boyun, kuyruk ve toplam defekt sonuçları	73
5.3	Histopatolojik Bulgular	75
5.3.1	Kontrol grubu histopatolojik bulguları.....	75
5.3.2	Diyabet grubu histopatolojik bulguları	78

5.3.3	Diyabet + Çörek Otu Yağı grubu histopatolojik bulguları	81
5.3.4	Diyabet + Metformin grubu histopatolojik bulguları.....	85
5.3.5	Diyabet + Vitamin E grubu histopatolojik bulguları	87
5.4	Grupların immunohistokimya ve TUNEL Assay Bulguları.....	90
5.4.1	PCNA immunohistokimya bulguları.....	90
5.4.2	Caspase-3 immunohistokimya bulguları.....	94
5.4.3	TUNEL Assay Bulguları.....	98
6	TARTIŞMA.....	103
7	SONUÇ	116
8	KAYNAKLAR	117
9	ÖZGEÇMİŞ	148
10	EKLER	150
10.1	Etik kurul onayı	150
11	ORİJİNALLİK RAPORU	151

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
AMH	: Anti Müllerian Hormon
AMP	: Adenozin Monofosfat
AMPK	: Aktive Edilmiş Protein Kinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAX	Bcl-2 ilişkili X Protein
BID	Bcl2 Associated Agonist of Celll Death
BCL-2	B-hücre Lenfoma-22
CAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
DHT	: Dihidrotestesteron
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Fas-L	: Fas Ligant
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz

GLUT	: Glikoz Taşıyıcı
GLUT – 1	: Glikoz Taşıyıcı – 1
GLUT – 2	: Glikoz Taşıyıcı – 2
GLUT – 4	: Glikoz Taşıyıcı – 4
HE	: Hematoksilen-Eozin
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LH	: Luteinizan Hormon
MIF	: Müllerian İnhibe Edici Faktör
MCT4	: Monokarboksilaz Taşıyıcı 4
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
OS	: Oksidatif Stres
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PCNA	Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni
PKC	Protein Kinaz C
RAGE	: İleri Glikoze Son Ürünleri
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
STBM	Seminifer Tubül Bazal Membran
STZ	: Streptozotosin
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TUNEL Assay	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end
T1DM	: Tip1 Diyabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
TQ	: Timokinon
α-TTP	: Alfa-Tokoferol Transfer Proteinindeki
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

RESİMLER LİSTESİ

Resim- 1: Testis kesiti	15
Resim- 2: Testis histolojik yapısı	16
Resim- 3: Testis seminifer tubülleri	17
Resim- 4: Spermiyogenez sırasında bir spermatidin Sertoli hücre sitoplazması içindeki TEM görüntüsü.	18
Resim- 5: Laparotomi ve testis rezeksiyonu.	50
Resim- 6: Epididimisin kıyma haline getirilme işlemi.	57
Resim- 7: Boya nüfuz eden (ölü) ve boyayı hücre dışında tutan (canlı) spermatozoonlar.	59
Resim- 8: Kontrol grubu testis kesiti.	76
Resim- 9: Kontrol grubu testis kesiti.	76
Resim- 10: Kontrol grubu testis kesiti.	77
Resim- 11: Kontrol grubu testis kesiti.	77
Resim- 12: Diyabet grubu testis kesiti.	78
Resim- 13: Diyabet grubu testis kesiti.	79
Resim- 14: Diyabet grubu testis kesiti.	79
Resim- 15: Diyabet grubu testis kesiti.	80
Resim- 16: Diyabet grubu testis kesiti.	80
Resim- 17: Diyabet grubu testis kesiti.	81
Resim- 18: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti.	82
Resim- 19: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti.	82
Resim- 20: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti.	83
Resim- 21: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti.	83
Resim- 22: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti.	84
Resim- 23: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti.	84
Resim- 24: Diyabet + metformin grubu testis kesiti	85
Resim- 25: Diyabet + metformin grubu testis kesiti.	86
Resim- 26: Diyabet + metformin grubu testis kesiti.	86
Resim- 27: Diyabet + metformin grubu testis kesiti.	87

Resim- 28: Diyabet + vitamin E grubu testis kesiti.....	88
Resim- 29: Diyabet + vitamin E grubu testis kesiti.....	88
Resim- 30: Diyabet + vitamin E grubu testis kesiti.....	89
Resim- 31: Diyabet + vitamin E grubu testis kesiti.....	89
Resim- 32: Kontrol grubu PCNA immunohistokimya mikrofafi.....	91
Resim- 33: Diyabet grubu PCNA immunohistokimya mikrofafi.....	92
Resim- 34: Çörek otu yağı grubu PCNA immunohistokimya mikrofafi.....	92
Resim- 35: Metformin grubu PCNA immunohistokimya mikrofafi.....	93
Resim- 36: Vitamin E grubu PCNA immunohistokimya mikrofafi.....	93
Resim- 37: Kontrol grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofafi.....	95
Resim- 38: Diyabet grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofafi.....	96
Resim- 39: Çörek otu yağı grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofafi.....	96
Resim- 40: Metformin grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofafi.....	97
Resim- 41: Vitamin E grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofafi.....	97
Resim- 42: Kontrol grubu kesitlerinde TUNEL Assay.....	100
Resim- 43: Diyabet grubu kesitlerinde TUNEL Assay.....	101
Resim- 44: Çörekotu yağı grubu kesitlerinde TUNEL Assay.....	101
Resim- 45: Metformin grubu kesitlerinde TUNEL Assay.....	102
Resim- 46: Vitamin E grubu kesitlerinde TUNEL Assay.....	102

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil- 1: Testis anatomisinin şematik görünümü	8
Şekil- 2: Testisin gelişim evreleri şematik görünümü	12
Şekil- 3: Erkek üreme fonksiyonunun hormonal düzenlenişinin şematik görünümü.....	14
Şekil- 4: Spermatogenezis şematik gösterimi	21
Şekil- 5: Seminifer epitelin şematik diyagramı	22
Şekil- 6: spermin şematik görünümü.....	25
Şekil- 7: STZ yapısı	32
Şekil- 8: Testis üzerinde ROS etkisi şematik görünüm.....	33
Şekil- 9: Timokinon Yapısı.	35
Şekil- 10: Metformin yapısı	36
Şekil- 11: Vitamin E'nin yapısı.	40
Şekil- 12: Apoptozis mekanizması	46
Şekil- 13 : Image J'de PCNA ve TUNEL Assay pozitifliklerin sayımı.	61
Şekil- 14: Caspase-3 analizine alınacak seminifer tubülün analiz için düzenlenmesi.....	62
Şekil- 15: Caspase-3 immunohistokimya için kantitatif verilerin elde edilmesi.....	63
Şekil-16: Grupların deney öncesi ve sonu vücut ağırlık ve kan şeker düzeylerinin istatistiksel analiz grafikleri.	65
Şekil-17: Grupların Testis, Seminal vezikül, Prostat ve Epididimis ağırlıklarının istatistiksel analiz sonuç grafikleri.	67
Şekil- 18: Grupların Johnsen Biyopsi Skor istatistik sonuç grafiği.....	68
Şekil- 19: Grupların Seminifer Tubül çaplarının istatistiksel analiz sonuç grafiği.	69
Şekil- 20: Grupların Tunika Albuginea ve Germinal Epitel kalınlıklarının istatistiksel analiz sonuç grafikleri.	70
Şekil- 21: Bazal Membran Kalınlığı istatistiksel analiz sonuç grafiği.	71
Şekil-22: Grupların Motilite, Konsantrasyon ve Vitalite istatistiksel analiz sonuç grafikleri.....	73
Şekil- 23: Grupların epididimal sperm Baş, Boyun, Kuyruk ve Toplam defekt oranlarının istatistiksel sonuç grafikleri.....	75

Şekil- 24: Grupların immunohistokimya ve TUNEL Assay istatistiksel analiz sonuç grafikleri.	99
---	----



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo- 1: Johnsen Testiküler Biyopsi skorlaması	60
Tablo- 2: Grupların deney öncesi ve deney sonu vücut ağırlık ve kan şeker düzeylerinin istatistiksel analiz değerleri	65
Tablo- 3: Testis, Seminal vezikül, Prostat ve Epididimis ağırlığı istatistiksel analiz değerleri.....	67
Tablo- 4: Grupların Johnsen Biyopsi Skor istatistiksel analiz değerleri	67
Tablo- 5: Grupların Seminifer Tubül çapı istatistiksel analiz değerleri	69
Tablo-6: Tunika Albuginea ve Germinal Epitel kalınlıklarının istatistiksel analiz değerleri	70
Tablo- 7: Grupların Bazal Membran Kalınlığı istatistiksel analiz değerleri	71
Tablo- 8: Grupların Motilite, Konsantrasyon ve Vitalite istatistiksel analiz değerleri ...	72
Tablo- 9: Grupların epididimal sperm Baş, Boyun, Kuyruk ve Toplam defekt istatistiksel analiz değerleri	74
Tablo- 10: Grupların PCNA immunohistokimya istatistiksel analiz değerleri	90
Tablo- 11: Grupların Caspase-3 immunohistokimya istatistiksel analiz değerleri	94
Tablo- 12: Grupların TUNEL Assay istatistiksel analiz değerleri	98

1 ÖZET

Çörek Otu Yağı, Metformin ve Vitamin-E' nin Deneysel Diyabetik Ratlarda Fertilite Potansiyeli, Testiküler ve Spermatolojik Karakter Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması.

Öğrencinin adı ve soyadı: Seval KAYA

Danışman: Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

1.1 TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik ratların testislerinde oluşan hasara karşı, çörek otu yağı, metformin ve vitamin E'nin olası etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: Otuz erkek rat beş eşit gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol, diyabet, diyabet+çörek otu yağı, diyabet+metformin ve diyabet+vitamin E grubu olarak ayrıldı. 4 grup, diyabet oluşturmak için tek doz streptozotosin (45 mg/kg, ip) ile indüklendi. Diyabet+çörek otu yağı grubuna (2.5 ml/kg/gün) çörek otu yağı, diyabet+metformin grubuna (100 mg/kg/gün) metformin, diyabet+vitamin E grubuna (100 mg/kg/gün) vitamin E oral yolla verildi. Sekiz haftalık deney sonunda kan şekeri düzeyleri analiz edildi. Histolojik incelemeler için testisler disseke edilerek, rutin parafin doku takibine alındı. Kesitlerde H-E, PAS ve Van Gieson'nın histopatolojik değerlendirmesi, PCNA ve kaspaz-3'ün immünohistokimyasal tespiti ve Apoptotik indeks için TUNEL-Assay uygulandı.

Bulgular: Diyabet Grubunda, tüm testis kesitlerinde seminifer tubüllerde düzensizlik, dejenerasyon ve atrofik tubüller izlendi. Çörek otu yağı grubu testis kesitlerinde, testiküler hasar çok hafif seyrediyordu. Metformin grubu testis kesitlerinde, lumene deskuame olmuş dejenere spermatogenik hücreler, damarlarda konjesyon ve interstisyel ödem izlendi. İmmünohistokimyasal incelemede ise Diyabet grubunda bazı spermatogenetik hücreler PCNA ekspresyonunda azalma, Kaspas-3 aktivitesinde artış ve TUNEL Assay

analizinde artış olduğu tespit edildi. Çörek otu yağı grubunda, Metformin ve vitamin E grubuna göre spermatogenetik hücrelerde apoptotik index daha azalma göstermiştir.

Sonuç: Diyabetin sıçan testislerinde oluşturduğu lezyonlarının tedavisinde metformin ile vitamin E'nin kısmen yararlı olduğu, buna karşı çörek otu yağının daha etkili olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler Testis, metformin, vitamin E, çörek otu yağı, streptozotosin



Comparison of the Protective Effects of Black Seed Oil, Metformin and Vitamin-E on Fertility Potential, Testicular and Spermatological Character in Experimental Diabetic Rats.

Student's Surname and Name: KAYA Seval

Adviser of Thesis: NERGİZ Yusuf Professor, PhD

Department: Histology ve Embriology

1.2 ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to compare the possible effects of black seed oil, metformin and vitamin E against testicular damage of diabetic rats induced by STZ.

Material and methods:

Thirty male rats were divided into; control, diabetes, diabetes+black seed oil, diabetes+metformin and diabetes+vitamin E groups. 4 groups were induced with a single dose of streptozotocin (45mg/kg) to induce diabetes. Diabetes+black seed oil group (2.5ml/kg/day) black seed oil, diabetes+metformin group (100mg/kg/day) metformin, diabetes+vitamin E group (100mg/kg/day) vitamin E were given orally. At the end of the eight-week experiment, blood glucose levels were analyzed. For histological examination, testes were dissected and taken for routine paraffin tissue protocol. Histopathological evaluation of H-E, PAS and Van Gieson, immunohistochemical determination of PCNA and caspase-3 and TUNEL-Assay were applied in the sections.

Results: In the Diabetes Group, irregularity, degeneration and atrophic tubules were observed in seminiferous tubules in all testicular sections. Testicular damage was very mild in the testicular sections of the black seed oil group. In the metformin group testicular sections, degenerated spermatogenic cells desquamated into the lumens, vascular congestion and interstitial edema were observed. In the immunohistochemical examination, some spermatogenetic cells in the Diabetes group were found to be decreased in PCNA expression, increased in Caspase-3 activity and increased in TUNEL Assay analysis. In the black seed oil group, the apoptotic index in spermatogenetic cells decreased more than Metformin and vitamin E groups.

Conclusion: Metformin and vitamin E are partially beneficial for treatment of testes lesions in diabetic rats, yet black seed oil is more effective than those two.

Key Words: Testis, metformin, vitamin-E, black seed oil, streptozotocin



2 GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM), kardiyovasküler sistem, böbrek, göz, sinir sistemi ve erkek üreme sisteminde ciddi komplikasyonlara neden olan ciddi bir sağlık sorunudur. Hem diyabetli erkeklerde hem de hayvan modeli üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada, DM'nin spermatogenez bozukluğu, testiste dejeneratif ve apoptotik değişiklikler, Sertoli / kan testis bariyerinde glikoz metabolizmasına zarar verme, azalmış testosteron sentezi ve sekresyonu, ejakülasyon disfonksiyonu ve düşük libido gibi çeşitli mekanizmalarla erkeklerde kısırlığa neden olduğu bildirilmiştir (1). Vücuttaki kan şekerinin düzenlenmesi, birçok kimyasal ve hormonun karmaşık etkileşiminin bir sonucu olarak sağlanır. Diyabetin düzenlenmesinde rol oynayan en önemli hormon pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonudur (2). Diyabetik sıçanlarda insülin tedavisi ile ilgili olarak, LH ve FSH seviyelerini kısmen veya tamamen iyileştirdiğini belirten çeşitli ifadeler vardır (1).

Diyabetes mellitus, sayısız komplikasyon ile birlikte ciddi bir metabolik bozukluktur. Kan şekeri seviyesinin artmasının çeşitli hedef doku ve organlarda yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açtığı iyi bilinmektedir (3). Erkek sıçanlarda deneysel olarak indüklenen diyabet, üreme sisteminin değişen fonksiyonları ile ilişkili bulunmuştur (4).

Sıçanlarda streptozotosin (STZ) indüklenmesi, diyabetin çeşitli organlar üzerindeki etkilerini incelemek ve değerlendirmek için bir model olarak kullanılır (5,6). Ayrıca, STZ'den kaynaklı diyabetik sıçanların testislerinde gözlemlenen morfolojik değişikliklere STZ'den ziyade diyabetin direkt etkisiyle oluşurlar. Sonuç olarak, diyabetin indüklenmesi için bu yöntem, hedef organların diyabetle ilgili değişikliklerinin araştırılması için uygulanabilir. Diyabetin testis fonksiyonu üzerindeki etkilerinin insülin eksikliğine ve daha sonra bu hormonun hem Leydig hem de Sertoli hücreleri üzerindeki düzenleyici etkisinin azaldığı bildirilmiştir (7). Bu bağlamda, gonadal disfonksiyonun ve testosteron üretim fonksiyonunda azalma olduğu iyi bilinmektedir (8–10). Diyabetik koşullarda üreme sistemi yapısının değişimi çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (3,11,12). Ayrıca, diyabetin vücut değişiklikleri ve testis ağırlığı üzerindeki etkisi bazı araştırmalarda bildirilmiştir. Ancak diyabetik durumlarda testisin çapı veya uzunluğundaki değişiklikler ile ilgili

alışmalar çok sınırlıdır. Diyabetik sıçanlarda; testiküler ağırlığın, sağlıklı ve streptozotosin dirençli sıçanlara kıyasla yüzde 20 civarında azaldığı bildirilmiştir (13). Diğer araştırmacılar, kısa sürede testiküler ağırlıkta bir artış ve uzun sürede testiküler ağırlığında bir azalma bildirmişlerdir. Veriler, vücut ağırlığının da azaldığını bildirilmiştir (3,13). Diyabetik hastalarda testosteron seviyesi düşer ve bu da gonadal ağırlıkta belirgin azalmaya neden olur. Ayrıca sperm sayısında azalma ve testis bazal membranında bozulmalara da işaret edilmiştir (14,15).

Değişik çalışmalarda gösterildiği gibi antioksidanlar, kemirgenlerdeki testiküler hasarı nleyebildiğinden, hipogliseminin oksidatif etkisini azaltmak için kullanılmaktadır (16–18). Vitamin E, diyabetin oksidatif stres etkisini tersine çevirmede çok iyi bir etkiye sahip antioksidan bir ilaçtır (19). Ayrıca vitamin E'nin antioksidan, antihipertansif karaciğer ve üreme koruyucu rolü dışında birçok etkisi vardır (20,21). Bazı alışmalar vitamin E'nin sigara dumanına maruz kalan sıçanların testislerinde lipid peroksidasyonunu azaltarak testiste oksidatif stresini azaltabildiğini göstermiştir (17,22). Ayrıca antidiyabetik ilacın antioksidanlarla kombine uygulanması böbrek, pankreas gibi diğer organlar üzerinde sinerjistik etki yapabilir ve bunu bildiren raporlar mevcuttur (17).

Metformin, diyabetin tedavisinde kullanılan hipoglisemik ilaçlardan biridir. Diyabette insülin duyarlılığını artırarak glikozun hiperglisemik durumda kolayca geçmesine izin vererek bu içi yapar (23). Metformin ayrıca yumurtalığın hacmi üzerindeki etkileri nedeniyle polikistik over ve erkek fetüslerin gonadlarındaki bozukluklarda tıbbi tedavi amacıyla kullanıldığına ilişkin rapor mevcuttur (24,25).

Çörek otu tohumları baharat ve gıda koruyucu olarak binlerce yıldır kullanılmaktadır. Yağ ve tohum bileşenleri, özellikle timokinon, geleneksel tıpta potansiyel tıbbi özellikler göstermiştir. Çörek otu tohumu, mşhil, idrar söktürücü olarak, bulaşıcı ateşi tedavi etmek, için cilt enfeksiyonları ve yaraları için de lokal tedavi olarak kullanılır. Nigella sativa tohumu ayrıca sa tedavisi, baş ağrısı, kulak ağrısı, doğum hastalıkları, diş ağrısı, sindirim sistemi bozuklukları, bez hastalıkları, karaciğer, dalak ve göz hastalıklarında da kullanıldığına ilişkin pek çok yayın mevcuttur (26,27).

Yapılan immunohistokimyasal analizlerde apoptozis zamanında hem Kaspaz-3 hem de aktifleşmiş kaspaz deoksiribonukleaz (CAD) spermatositlerin çekirdeklerinde lokalize olduğuna dair yayınlar mevcuttur (28).

Bu çalışmada streptozotosin ile oluşturulan diyabet sonucu rat testis dokusunda meydana gelen hasara karşı çörek otu yağı, metformin ve vitamin E'nin koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

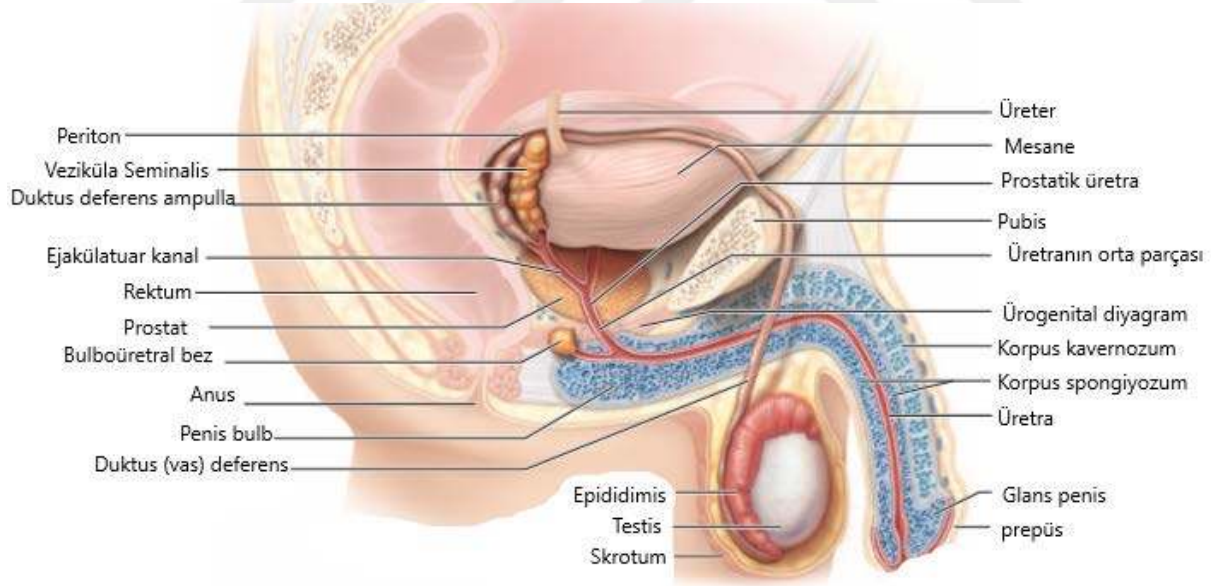


3 GENEL BİLGİLER

3.1 Testis

3.1.1 Testis anatomisi

Testis, vücut boşluğunun dışında, deri ve fibromusküler bir kese olan skrotum içinde asılı olarak bulunan oval şekilli bir çift organdır. Skrotum, karın duvarının aşağıya doğru kese şeklinde çıkıntı yapması ile oluşur ve içeride testislerin taşınması amacıyla ikiye bölünür. Testisler fetal dönem boyunca karın boşluğunda bulunurlar; ancak gestasyonel dönemin 7. ayında skrotuma inerler. Spermilerin üretim görevini üstlenen testisler, bulunduğu ortam sıcaklığının vücut ısısından 2-3°C düşük olması gerekmektedir. Ortalama testis boyutlarının uzunluğu 4-5 cm, genişliği 2.5 cm, anteroposterior çapı 3 cm'dir; ağırlıkları 10.5-14 g arasında değişmektedir. Sol testis genellikle sağ testise göre biraz daha aşağıda yer almaktadır (29).



Şekil- 1: Testis anatomisinin şematik görünümü (30).

Testis tunika vaginalis, tunika vasküloza ve tunika albuginea olmak üzere üç tabaka ile sarılmıştır. Tunika vaginalis testis yapısının iki yaprağı bulunur. Bunlar;

Lamina Visceralis (epiorchium), testisin ön kenarıyla iki yüzünü örtmektedir. Arka kenarın lateral ile medial taraflarında ise kendi üstüne doğru kıvrım yaparak lamina parietalisle devam eder.

Lamina Parietalis (periorchium), testisin alt kısmından üst kısmına doğru, funikulus spermatikus'un ön ve iç tarafını da kaplayacak biçimde uzanır. İki lamina arasında bir boşluk oluşur. Ayrıca bu boşlukta az miktar da seröz sıvı bulunur. Tunika vaginalis testisin iç tarafında da, testisleri saran iki tabaka daha vardır. Bunlar tunika vaginalis testisten içe doğru tunika albuginea ve tunika vaskülozadır.

Tunika Albuginea, testisleri dıştan sarar. Genişleyebilme özelliği ve elastik yapısı bulunmayan kalın fibröz yapıda bir tabakadır. Arka kenardan testis içine doğru girerek **mediastinum testisi** meydana getirir. Mediastinum testis, testisin extremitas superiorundan extremitas inferiorun yakınına uzanır. Önündeki ve yanındaki uzantılara **septula testis** denilmektedir. Testisin parankiminden geçerek tunika albugineanın iç yüzeyine gelirler. Bu sayede testisi koni biçiminde lobuluslara böler. Lobuli testislerde yapılan spermiyumlar rete testisten duktuli efferentes kanalları aracılığıyla epididimise gelir.

Tunika Vasküloza, tunika albugineanın iç yüzünü örten ve testisin damar ağından oluşan bir tabakasıdır (31,32).

Tunika albuginea ve septula testisler arasındaki boşluklarda lobuli testis olarak adlandırılan ve sayıları 200-300 arasında parenkima bulunur. Lobuli testis piramit şeklinde olup, alt kısımları periferde, üst kısımları ise mediastinum testise yönelmiştir. Lopçukların her biri, 1 ile 4 veya daha fazla sayıda küçük tüpler şeklindeki parenkimden oluşmuştur. Ayrıca kör uçla başlayan bu tüplere, kıvrıntılı seyretmesinden kaynaklı tubuli seminiferi kontorti denilmekte olup, tüpler arasında da gevşek bağ dokusu bulunur. Bu tüpler, yaklaşık olarak her bir testiste 250 lobüle, uzunlukları yaklaşık 50 cm, çapları da 150-250 µm kadardır. Üst kısımları mediastinum testise bakan lopçukların bu bölgede, seyri gittikçe düzleşir ve birbirleriyle kaynaşarak sayıları 20 ile 30'a kadar inmektedir. Mediastinum testisin fibröz

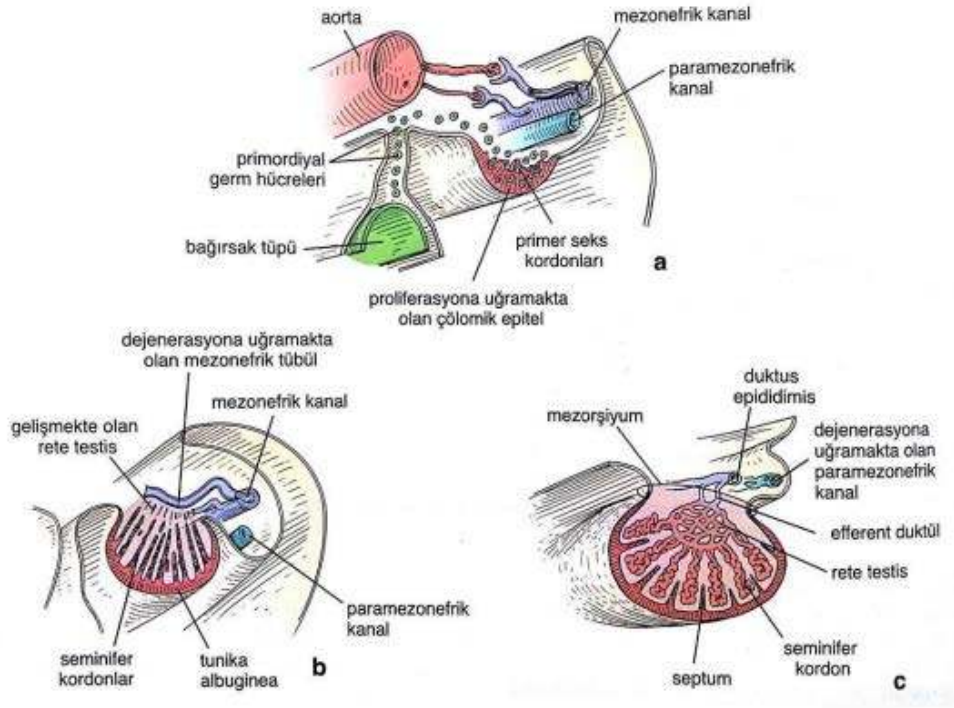
dokusu içine tubuli seminiferi rectiler girerek arkaya ve yukarıya doğru uzanırlar. Bu kanallar seyri esnasında birbirleriyle birleşerek rete testis denilen ağı oluşturur.

Ardından bu kanallar Duktuli efferentes testise dönüşür ve testisin arka kenarının üst kısmında, tunika albugineayı delerek dışarı çıkarlar. Başlangıçta dışarı çıkan kanallar düz seyir eder. Ardından kalınlaşıp kıvrıntılı devam eder ve lopçukları oluşturur. Lobuli koni epididimidis denilen bu lopçukların yükseklikleri ortalama 1 cm dir. Bunların üst kısımları testis'e, alt kısımları ise epididimis'e bakarlar. Her bir lopçuk açıldığı zaman boyu 15-20 cm'yi bulan tek bir kanaldan oluştuğu görülür (Bazen 1 ile 3 veya daha fazla kanaldan oluşabilir). Duktuli efferentes testis'ler duktus epididimis denilen kanala açılıp başlangıç kısmını oluşturur. Duktus epididimis yaklaşık 6 m uzunluğunda olup, testisin arka kenarında kümeler oluşturarak korpus epididimis ve kauda epididimisi oluştururlar. Epididimis kıvrımlı bir yapıdadır ve bu kıvrımlarını gevşek bağ dokusu birbirine bağlar. Epididimis içinde spermiyumların depo edilip olgunlaşmasının son safhası tamamlanır (30,32).

3.1.2 Testis embriyolojisi

Testis, mezodermal epitel (çölomik mezotelyum), altta uzanan mezenşim ve primordiyal germ hücrelerinden gelişmektedir. Embriyonal gelişimin beşinci haftasında mezonefrozun medial tarafında kalınlaşmış bir mezotel alanın gelişmesiyle gonadal gelişim başlar. Bu epitelin ve altta uzanan mezenşimin proliferasyonu, mezonefrozun medial tarafında, gonadal kabartıyı meydana getirir. Parmak benzeri gonadal kordonları (epitel kordonlar) altta uzanan mezenşim içine doğru kısa bir süre sonra büyür. Farklanmamış gonadlar, bir iç medulla ve bir dış korteksten oluşmaktadır. Emriyo XY kromozomuna sahip ise medulla bir testise farklanırken artık katlantılar dışında korteks gerilemektedir. Dördüncü haftanın başında primordiyal germ hücreleri, vitellus kesesinin duvarında endodermal hücreler arasında gözlenmektedir. Primordiyal germ hücreleri bağırsağın dorsal mezenter boyunca göç ederler. Primordiyal germ hücreleri altıncı haftada altta uzanan mezenşime girer ve gonadal katlantılara içinde yer alırlar (33).

Fertilizasyon sırasında kromozomal seks belirlenir. Fakat morfolojik olarak yedinci haftaya kadar benzer kalırlar. Testis gelişimi, Y kromozomunun kısa kolundaki SRY genine bağlıdır. SRY geni tarafından testis belirleyici faktör (TDF)'ü kodlanır. Testis belirleyici faktörün etkisi altında primitif seks kordonları, testis veya medüller kordonları oluşturmak için medulla derinlerine doğru nüfuz eder. Daha sonra kordonlar dallanma ve anastomoz oluşturarak rete testis tubüllerini oluşturur. Gelişim devam ederken yoğun fibröz bağ dokusu olan tunika albuginea testis kordonları yüzey epitelinden uzaklaşır. Testis kordonları dördüncü ayda at nalı şeklinde görünüm alırlar ve uzantıları rete testis ile devamlılık gösterir. Testis kordonları yüzey epitelinden oluşan sertoli hücreleri ve primitif germ hücrelerinden oluşmaktadır. Gonad katlantıdaki orijinal mezenşimden interstisyel Leydig hücreleri oluşur ve testis kordonları arasında yer alır. Gebeliğin sekizinci haftasında Leydig hücreleri, testesteron üretmeye başlar. Aynı zamanda genital kanalların ve dış genital organların cinsel farklılaşmasını uyarabilirler (34). Sertoli hücrelerinden Anti Müllerian Hormon (AMH) salgılanır. Büyük bir glikoprotein olan AMH, tuba uterinaları ve uterusu oluşturan paramezonefrik kanalların gelişimini inhibe eder (33,35). Aynı zamanda 5 α -redüktaz aracılığıyla testesteronun dönüşüm ürünü olan dihidrotestesteronun (DHT) etkisi ile dış genital organların gelişimi ve farklılaşması sağlanır (35). Testis kordonları puberteyle birlikte lumen oluşturup seminifer tubülleri meydana getirirler. Daha sonra seminifer tubüller, duktuli efferentes giren rete testise tutunurlar. Duktuli efferentesler, mezonefrik duktusa açılırlar ve mezonefrik duktus bu bölgede duktus epididimise dönüşür. Epididimis distalinde mezonefrik duktus, kalın düz bir kas tabakası kazanır ve duktus deferens meydana gelir. Mezonefrik duktusların kaudal uçlarının lateralinde dışa doğru seminal vezikül gelişir. Ejakulatuar duktus ise seminal veziküllerin duktusu ile uretra arasında kalan mezonefrik duktus bölümünden gelişmektedir (Şekil-2) (34,36).



Şekil- 2: Testisin gelişim evreleri şematik görünümü (35).

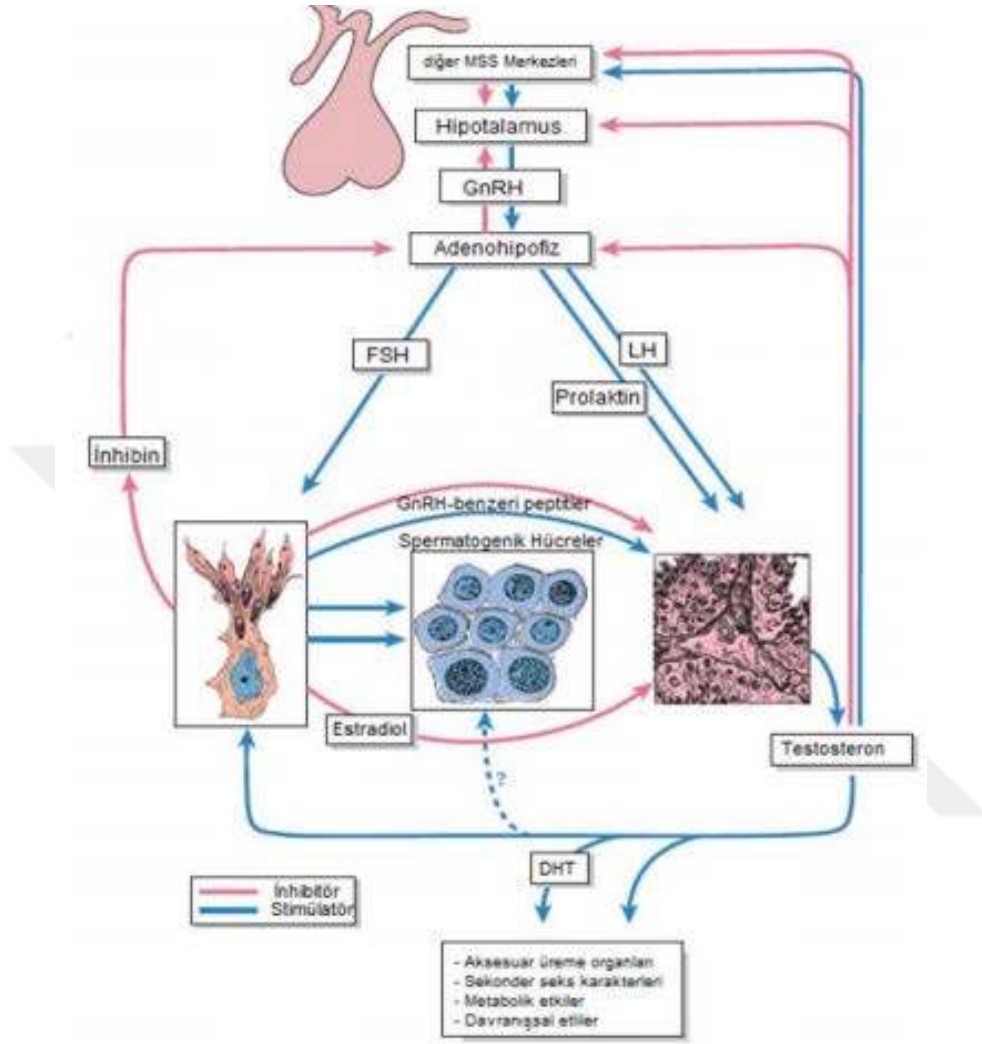
3.1.3 Testis fizyolojisi

Testisler hem ekzokrin hem de endokrin işlev gören bir çift organdır. Endokrin salgısı testosteron hormonu ekzokrin salgısı ise spermiumdur. Testisler bu işlevleri yerine getirirken hormonların etkisi altındadır.

Testosteron, interstisyel Leydig hücrelerinde oluşturulur. Leydig hücreleri, seminifer tübüllerin arasında yer alıp testis kitlesinin %20'sini oluşturur. Testosteron, androjen olarak tanımlanan steroid yapıda bileşiklerdir. Androjenler, kolestroiden ya da direk olarak asetil koenzim A'dan sentezlenirler. Genel olarak testosteron, belirgin erkek vücut karakterlerinin oluşumdan ve erişkinde primer ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumludur. Fetal yaşamda, plasentadan oluşan koryonik gonadotropinler ile uyarılan testis, testosteron salgılar. Fetal gelişim sürecinde ve doğumdan sonra da kısa bir süre testosteron hormonu vücutta bulunmaktadır. Fakat puberte dönemine kadar üretilmez. Puberte döneminde ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarısıyla tekrar üretilmeye başlar ve devam eder.

Testislerden salgılanan testesteron, salgılandıktan sonra yaklaşık %97'si zayıf bağlar ile plazma albümini veya daha sıkı bir şekilde seks hormonu bağlayan globülin olarak isimlendirilen bir β globülin ile bağlanır. Dolaşım sisteminde bu bağlı hormon yarım saat ya da bazen bir saat civarı kalabilir. Bu süre sonunda, testosteron dokulara fikse olur veya inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır. Testosteron, dokulara fikse olduğunda hücre içinde genellikle dihidrotestosterona dönüşür. Bu olayın gerçekleştiği hedef organlar, erkek fetusta eksternal genital organlar ve erişkinlerde özellikle prostat bezidir.

Prostat bezinde, testosteron hücre içine salgılandıktan birkaç dakika sonra girer. İntraselüler 5α -redüktaz enziminin etkisi altında dehidrotestosterona dönüşür ve sitoplazmik reseptör proteinine bağlanır. Ardından reseptör-hormon kompleksi nükleusa girer ve nüklear bir protein ile bağlanarak DNA-RNA kayıt işlemini uyarır. 30 dk içerisinde RNA polimeraz aktifleşir ve prostat hücrelerinde RNA konsantrasyonu artar ve protein artışı izlenir. Testosteron genel olarak vücudun her yerinde protein yapımını büyük oranda artırır özellikle sekonder seks karkterlerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef organ ve dokularda görülmektedir (37,38).



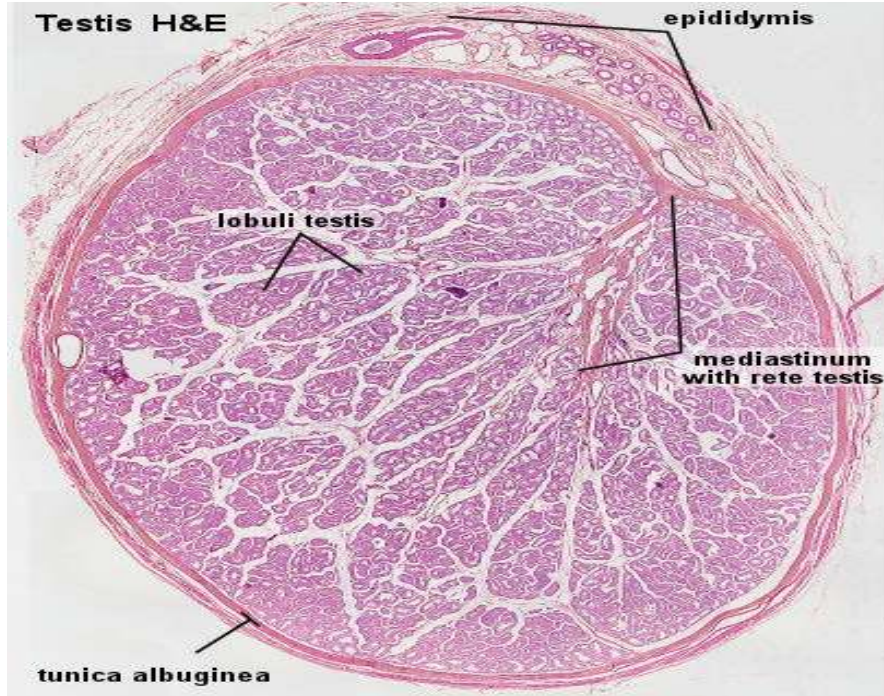
Şekil- 3: Erkek üreme fonksiyonunun hormonal düzenlenişinin şematik görünümü (35).

Erkek seksüel fonksiyonların kontrolü hipotalamustan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) sekresyonu ile başlar. GnRH, ön hipofiz bezini uyarır ve gonadotropik hormonlar olan luteinizan hormon (LH) ve folikül stimülan hormonun (FSH) salgılanmasını sağlar. LH testislerden testosteron salgılanması için uyarıcı olurken FSH ise öncelikle spermatogenezini stimüle etmektedir. Luteinizan hormon, Leydig hücrelerindeki reseptörlere tutunur ve sperm maturasyonu için gerekli olan testosteron salınımını uyarır. Folikül stimülan hormon, seminifer tubüllerde özgül FSH reseptörleri ile Sertoli hücrelerine bağlanır. Bu şekilde hücre büyümesi ve çeşitli spermatogenik maddelerin salgılanması sağlanır. Bir süre sonra testosteron, ön hipofiz bezini uyarır ve LH ile FSH

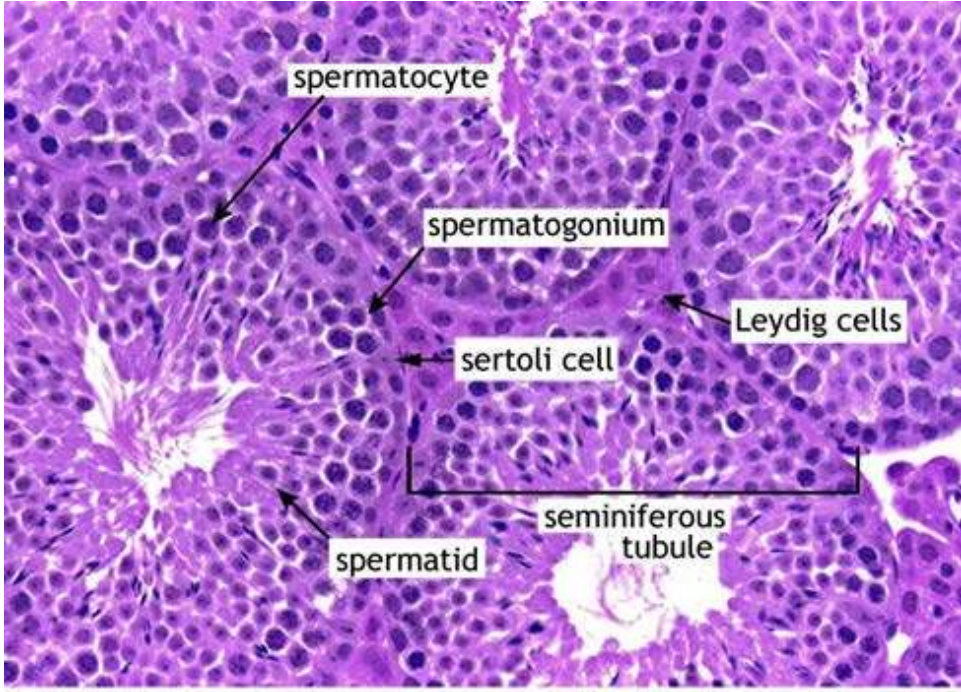
üretimini baskılar. LH ve FSH miktarındaki azalma ile testislerde üretilen testosteron miktarı da azalmıştır. Spermatogenezin azaldığı durumda ise ön hipofiz bezinden FSH salgısı artar ve tekrar spermatogenez artmaya başlar (Şekil-3) (37,38).

3.1.4 Testis histolojisi

Testis karın boşluğuna inerken beraberinde sürüklediği periton tabakasına tunika vajinalis denir. Bu tabaka testisin en dış tabakasıdır. En iç tabakası da kan damarından zengin gevşek bağ doku özelliğinde olan tunika vaskülozadır. Testisin arka yüzünde tunika albuginea kalınlaşarak içeriye doğru uzanır ve buna mediastinum testis denir. Lenf damarları, genital boşaltım kanalları ve kan damarları mediastinum içinde uzanırlar. Kapsülden her bir testis içine uzanan septumlar, testisi yaklaşık 250 adet lobüle ayırmaktadır. Testis içerisindeki lobülerde, 1-4 adet seminifer tubül adı verilen yapılar ve bağ dokusu yer almaktadır. Seminifer tubüller oldukça kıvrımlı olup sperm üreten yapılardır. Bu tubüller yaklaşık 30-50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır. Tubüller, lobüllerin apeksinde düz seyrederek ve tubuli rekti olarak adlandırılır. Tubuli rekti, mediastinumda anastomozlaşan kanallar olan rete testis ile devam etmektedir (Resim-1) (39,40).

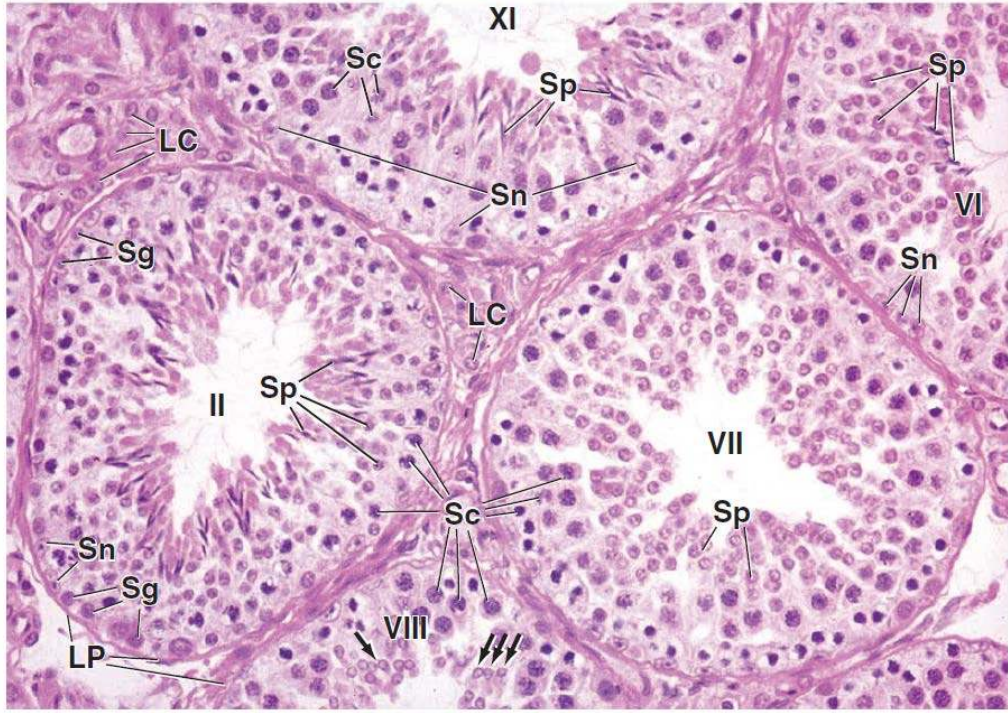


Resim- 1: Testis kesiti- H&E (41).



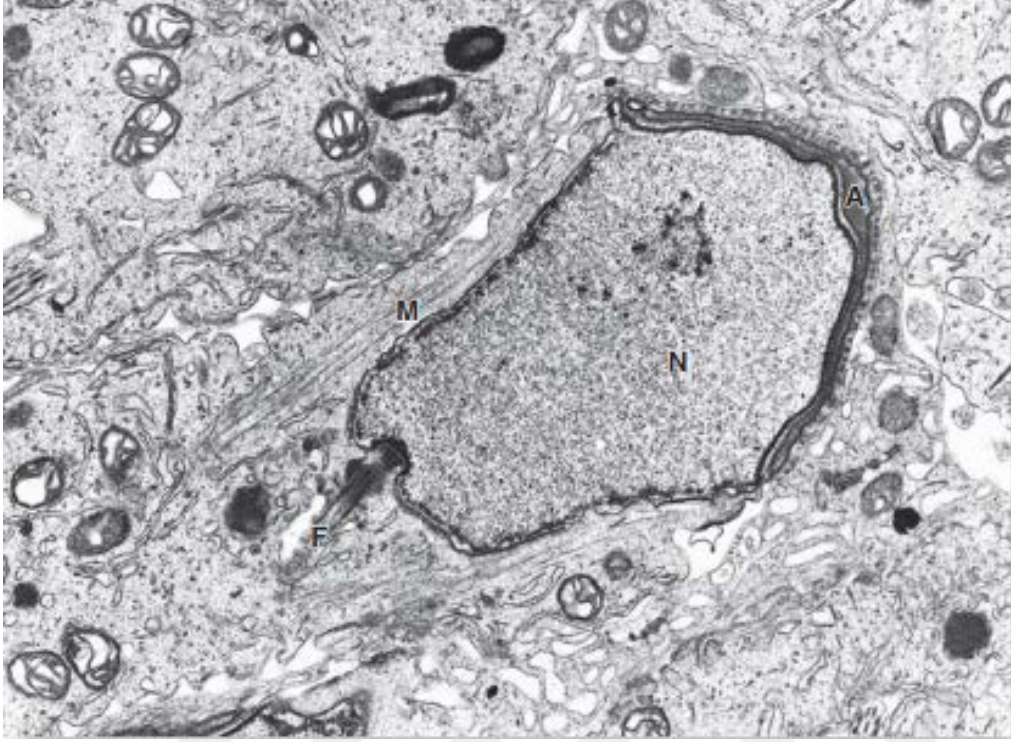
Resim- 2: Testis histolojik yapısı (42).

Seminifer tubüller yassı miyoid hücrelerden oluşan tabaka ve bir bazal membran ile kuşatılmıştır. Her bir tubül sıra dışı, iki temel hücre popülasyonundan oluşan karmaşık, çok katlı bir epitel ile örtülüdür. Epitelde spermatogenetik hücre ve sertoli hücreleri bulunmaktadır (Resim-2) (35,39,43).



Resim- 3: Testis seminifer tubülleri. LC: Leydig hücreleri, LP: lamina propria, Sc: spermatositler, Sg: spermatogonia, Sn: Sertoli çekirdekleri, Sp: spermatidler, oklar: erken şekil değişikliği gösteren spermatid çekirdekleri (35).

Sertoli hücreleri, sustentaküler veya destek hücreleri olarak da adlandırılmaktadır. Sertoli hücreleri puberte döneminden sonra çoğalmazlar. Sertoli hücreleri puberte sonrasında seminifer tubül epitelinin yaklaşık %10 kadarını oluşturmaktadır (39). Tamamen farklılaştığında, Sertoli hücresi, seminifer epitelin tabanından, taban zarından tubüllerin lumenine uzanan, büyük boyutlu, sütun şeklinde bir epitel hücresidir (44,45). Sertoli hücrelerinin bazal kısmı, seminifer tubüllerin yapısal bütünlüğünü koruyan çeşitli hücre dışı matris proteinlerinden (laminin, kollajen ve heparan sülfat gibi) oluşan lifli bir yapı olan bazal membrana (veya bazal lamina) yapışır (46). Bu hücreler prizmatik yapıda olup bazal membranda uzanırlar. Aynı zamanda spermatozoonların seminifer tubül lumenine salınıncaya kadar spermatidlerin yerleştiği derin girintilere sahiptirler.



Resim- 4: Spermiyogenez sırasında bir spermatidin Sertoli hücre sitoplazması içindeki TEM görüntüsü, sperm çekirdeği (N), Golgi türevi akrozomal kapak (A), Flagellum (F), Manşet (M) (x7500) (42).

Sertoli hücreleri, düzgün olmayan ökromatik bir çekirdeğe ve çekirdekçiğe sahiptir. Ayrıca oldukça fazla ve değişik şekillere sahip mitokondriyon, düz endoplazmik retikulum, granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi aygıtı, mikrotübüller, lizozomlar, filamentler, veziküller ve lipid damlacıklarına sahiptir. Aynı zamanda bazal sitoplazmada inklüzyon cisimciklerine (Charcot-Böttcher) sahiptir. Inklüzyon cisimciklerinin, Sertoli hücrelerinin lipidleri kullanımında ve lipid transportunda yer aldıkları düşünülmektedir. Sertoli hücreleri spermatogenetik hücrelerin beslenmesi, korunması ve salınımında görev almaktadır. Sertoli hücreleri birbirlerine yan ve taban yüzeylerindeki sıkı bağlantı kompleksleri ile tutunur. Bağlantı kompleksleri epiteli bazal ve luminal kompartmanlara ayırır. Bu şekilde Sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturur ve bu bariyer spermatogonyumlar ile primer spermatositleri daha tepedeki sekonder spermatositler ve spermatidlerden ayırır. Aynı zamanda tubül içindeki yapılar dolaşımdaki antijenlerden yalıtılır ve spermatositler ve spermatidleri otoimmün bağışıklıktan ve kanda bulunan

maddelerden korumaktadır (39). Aynı zamanda seminifer tubül lumen sıvısı sperm taşınmasını sağlamanın dışında spermatogenezis içinde uygun bir mikro ortam oluşturmaktadır. Seminifer lumen sıvısı diğer hücre dışı sıvılardan daha yüksek bir K⁺ konsantrasyonu, Na⁺ ve Cl açısından zengindir. Sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturmasıyla bu sıvı oldukça kararlı bir haldedir. Hücre içi tamponların ve yapısında yer alan iyon kanalları ile sıvının pH'ını ve ozmolaritesini düzenlemektedir (47).

Sertoli hücrelerinin işlevinin temel düzenleyici faktörleri hormonlardır. Folikül uyarıcı hormon, seks steroid hormonları, tiroid hormonu ve insülin önemli bir yere sahiptir. Hipotalamus, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) sentezler ve bu hipofizi uyarak luteinize edici hormonu (LH) ve folikül uyarıcı hormonu (FSH) üretmesi sağlar. LH, Leydig hücrelerine membran reseptörlerini bağlar ve testosteron (T) üretimini uyarır. FSH, membran reseptörlerini Sertoli hücrelerine bağlayarak 17p-östradiol, aktivin ve inhibin B'nin üretimini ve salgılanmasını uyarır. 17p-östradiol, testosteron üretimini inhibe eden Leydig hücrelerine etki eder. Aktivin ve inhibin B, hipofiz üzerinde sırasıyla pozitif veya negatif bir geri bildirim üretir. Ayrıca, Sertoli hücreleri FSH etkisi ile adrojen bağlayıcı protein (ABP) salgılar. ABP testesterona bağlanır ve spermatogeneziste rol almaktadır. Ayrıca inhibin hormonu salgılayarak FSH salınımını inhibe eder ve aktivin, plazminojen aktivatörü ve müllerian inhibe edici faktör (MIF) gibi çok sayıda hormonu da sentezlemektedir. Sertoli hücreleri, farklılaşmayı tamamlayamayan spermatogenik hücreleri ve spermatitlerin spermatozoaya dönüşürken fazla sitoplazmadan köken alan rezidüel hücreleri de fagosit etmektedir (43,48).

Testiste seminifer tubüller arasındaki gevşek bağ dokuda kolestrolen testosteron salgısı yapan Leydig hücreleri yer almaktadır. Leydig hücreleri kolestrole bağlı lipid içermesinden kaynaklı soluk asidofilik boyanır. Leydig hücreleri bir veya iki çekirdekçiğe sahip bir çekirdeği bulunmaktadır. Aynı zamanda steroid salgılayan hücelere özgü bol miktarda düz endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Ribozom, tubüloveziküler kristal mitokondiyon, golgi kompleksi, lüpopuksin pigmenti ve sitoplazmalarında çubuk şekilli foksionları tam olarak bilinmeyen Reinke kristalleri yer almaktadır (39,48).

Erken fetal yaşamda Leydig hücreleri farklılaşarak testosteron salgısını yapar. Embriyoda, pubertede ve yetişkinlerde testosteron salgılanması çok önemlidir. Testosteron embriyoda, erkek fetusta gonadların gelişimi için gerekmektedir. Pubertede sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişiminde, devamında, sperm üretiminin başlatılmasında ve aksesuar cinsiyet bezlerinin salgılarında önemlidir. Yetişkinlerde ise aksesuar cinsiyet bezlerin, spermatogenezin, sekonder cinsiyet karakterlerin ve genital boşaltım kanallarının kontrolünde ve devamlılığı için gerekmektedir (39,43).

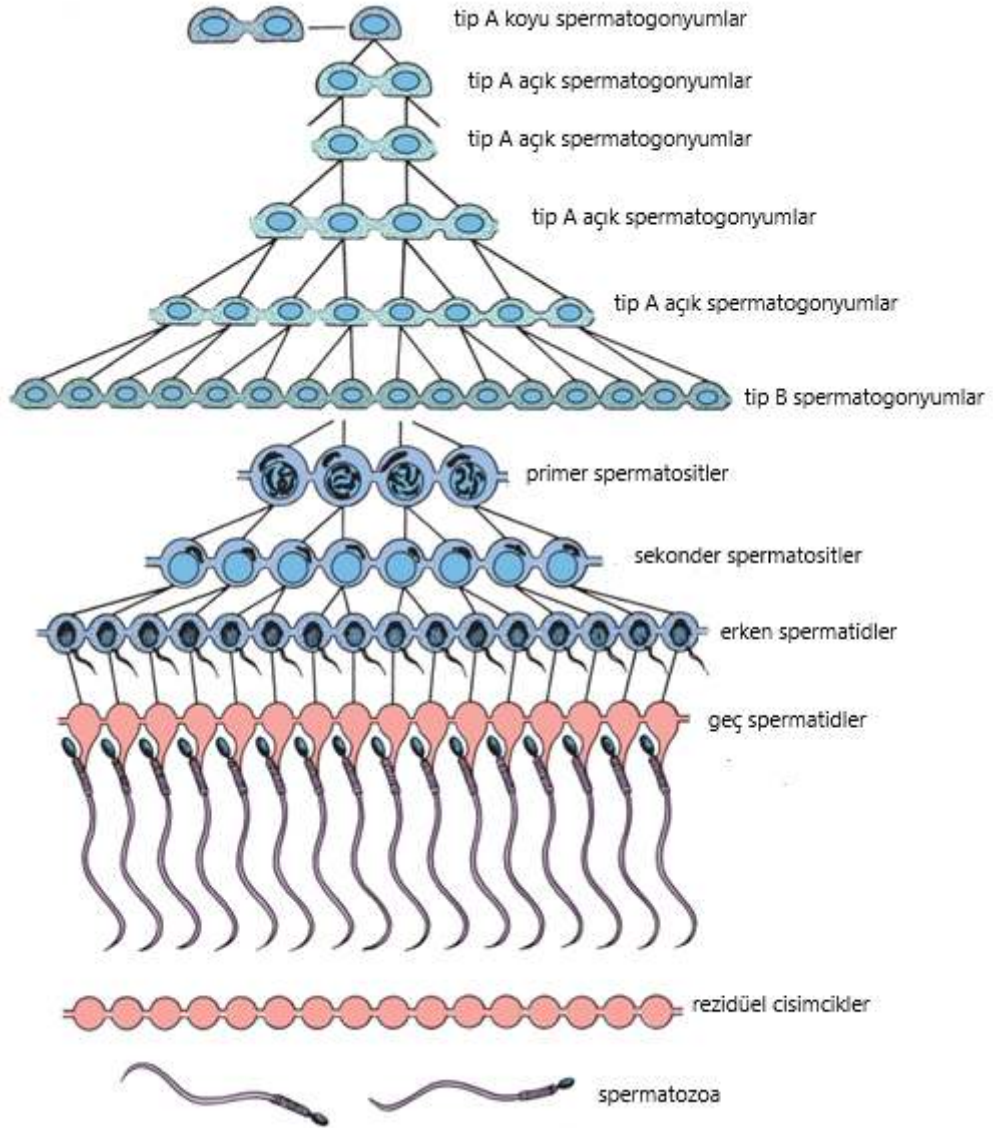
Spermatogenezis

Spermatogenez, olgunlaşmamış kök hücrelerinin milyonlarca olgun sperm hücresine yol açmak için mitotik bölünme, mayoz ve farklılaşma geçirdiği bir endokrin ağı ve diğer düzenleyici faktörler tarafından kontrol edilen bir süreçtir (49).

Diploid spermatogonyumlardan haploid sperm gelişim süresine spermatogenez denilmektedir (39). Bu süreç üç faza ayrılmaktadır; spermatogonyal faz, spermatosit faz ve spermatid faz (Şekil-4), (50).

Spermatogonyal faz

Spermatogonyal fazda, diploid kök hücreler seminifer tubüllerin bazal membranına komşu yerleşmiş olup, Sertoli hücreleri arasındaki zonula okludenslerin altında yer alırlar ve kan-testis bariyerinin dışındadır. Spermatogonyal kök hücreler çok sayıda mitoz bölünmeler geçirmektedir. İnsan testisinde bu hücreler H&E preparatlarında 3 tip nükleer görünüme sahip hücrelere dönüşmektedir (35,51) .

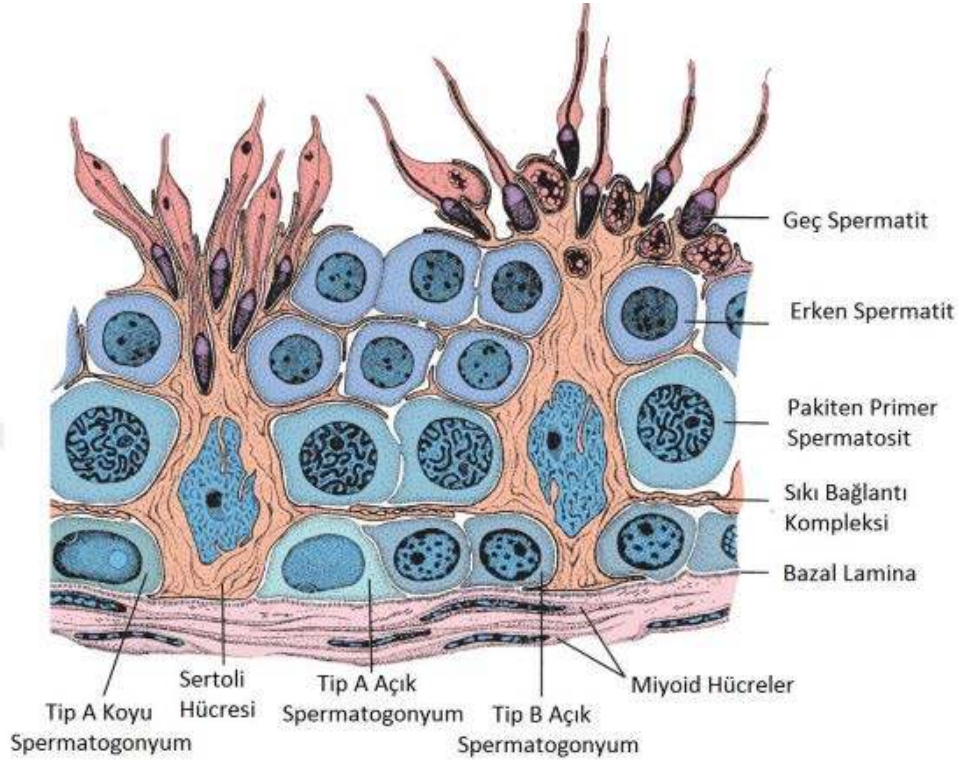


Şekil- 4: Spermatogenezis şematik gösterimi (35).

Tip A koyu spermatogonyumlar; nukleusları, oldukça yoğun bazofilik ince granüllü kromatinli oval hücrelerdir. Bu hücreler kök hücreler olarak düşünülmekte olup, düzensiz aralıklar ile bölünerek, tip A koyu veya tip A açık spermatogonyumları meydana getirmektedir.

Tip A açık spermatogonyumlar; açık boyanan soluk, ince granüllü kromatinli oval hücrelerdir. Mitoz bölünmeler geçirerek tip A açık spermatogonyumları meydana getirir ve tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar.

Tip B spermatogonyumlar; merkezi bir nukleolusa sahip olup, nukleolusun etrafında geniş kümeler oluşturan yoğun kromatinli yuvarlak nükleuslara sahiptir. Ayrıca bu hücreler mitoz bölünme ile primer spermatositleri oluşturarak spermatosit fazına geçiş sağlanmış olmaktadır (51,52).



Şekil- 5: Seminifer epitelin şematik diyagramı (35).

Spermatosit fazı

Primer spermatosit; germinal epitel bölgesinde yer almakta olup seminifer tubüllerin en büyük germ hücreleridir. Mayoz bölünme başlamadan önce DNA'ları replike olur. 4d miktarında DNA ve 2n sayıda kromozom içermektedir. Primer spermatosit mayoz I'in profaz evresine girer ve bu evre uzun sürmektedir (1-3 hafta). Ardından her bir primer spermatosit mayoz I'de DNA miktarını 4d'den 2d'ye ve kromozom sayısını da 2n'den 1n'ye (haploid) getirir ve mayoz I'in sonunda primer spermatositlerden bir çift halinde haploid kromozom içeren sekonder spermatositler meydana gelmektedir. Sekonder

spermatosit; birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı olan haploid kromozom içeren sekonder spermatositler hızlıca mayoz II' girer. Mayoz II'nin sonunda her bir sekonder spermatositten 1n kromozomlu (23 tek iplikli) ve 1d miktarında DNA'ya sahip olan iki haploid spermatid meydana gelmektedir (35,53).

Spermatid Fazı

Aynı zamanda bu faza spermiyogenez de denilmektedir. Spermatogenezin son aşaması olan spermiyogenez, mitotik yönden aktif olmayan spermatidlerin hücrel ve nükleer hacminin % 80-90'ının kayba uğrayarak morfolojik değişikliklere uğrayıp olgun spermin meydana geldiği fazdır (54).

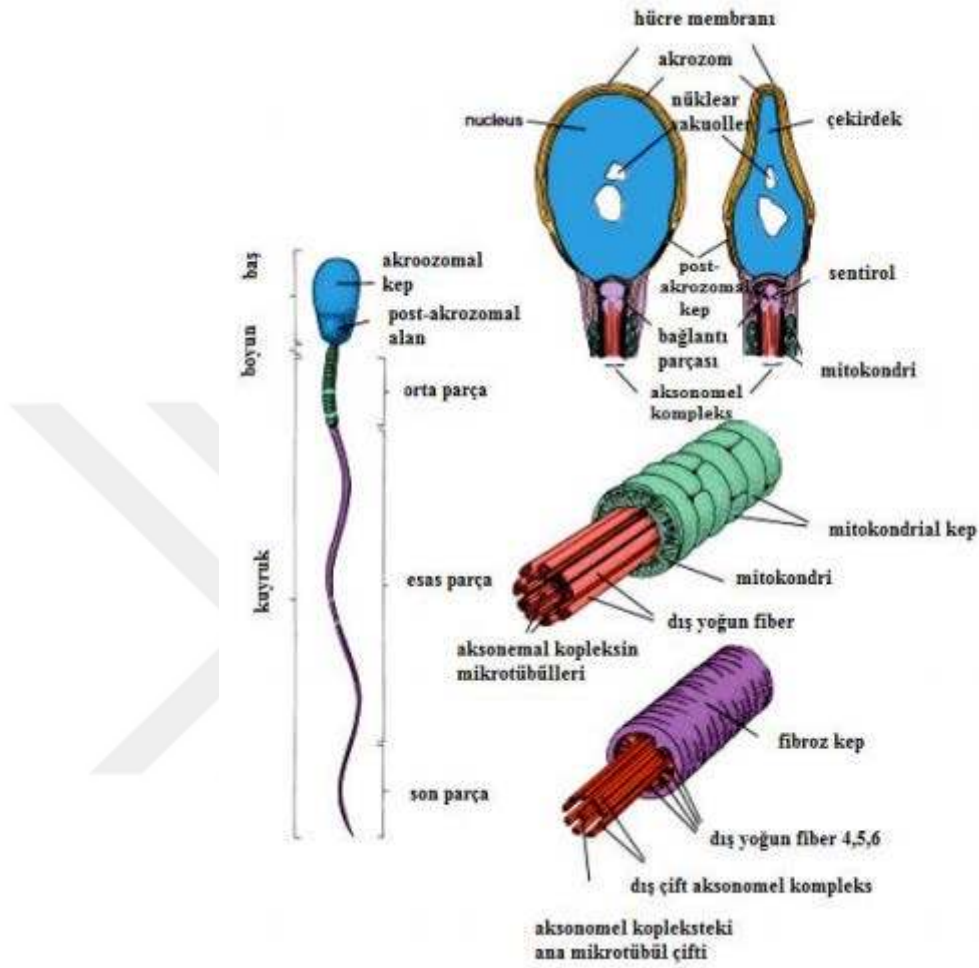
23 kromozoma sahip spermatid hücreleri, 22 otozom ve bir X veya bir Y kromozomu taşımaktadır. Spermatid fazda spermatid hücreleri Sertoli hücrelerinin membranına gömülü bir şekilde yer almaktadır. Ayrıca bu faz kendi içerisinde dört faza ayrılmaktadır;

Golgi fazı; spermatid yapısında yer alan çok sayıda golgi kompleksi içerisinde kümelenmiş periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif boyanan glikoproteinden zengin proakrozomal granüllerin yer alması ile karakterize bir fazdır. Hiyalüronidaz, proakrosin ve diğer hidrolitik enzimleri içeren proakrozomal veziküller, motor proteinleri (sırasıyla kinesinler ve miyozin Va) kullanılarak Golgiden akroplaksom içine taşınır. Akroplaksom, nükleer zarfa tutturulmuş aktin sitokeratin içeren bir plakadır. Proakrozomal veziküller, önce akrozom vezikülü ve daha sonra akrozomal keseyi oluşturmak için akroplaksomu bağlar ve sabitler (55). Aynı zamanda gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Jukstanükleer bölgedeki sentriyoller de spermatidin arka kutbuna yerleşir. Sentriyol sperm kuyruğunun aksonemin oluşumunu başlatmak için arka kutupta sentriyol plazma membranına dik açıyla yerleşerek, dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübül parçalarının bir araya gelmesini sağlar.

Kep fazı; akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerinde yayılarak akrozomal kep yapısını meydana getirmektedir. Bu kısım baş kısmının üçte ikisini meydana getirmektedir. Nüklear içerik yoğunlaşır ve nüklear zarf parçası porlarını kaybederek kalınlaşır.

Akrozom fazı; Sertoli hücresi içine gömülü olan spermatid akrozom fazında baş kısmını sertoli hücresi içine iyice gömerek bazal laminaya ilerler. Flagellum gelişmeye devam ederken seminifer tubül lumenine uzanmaktadır. Spermatid nukleusu yassılaşılarak uzamaya devam eder. Daha önce flagellumun gelişimi başlatan nukleusa tutunan sertriyollerden dokuz kalın fibril gelişerek kuyruğun içine doğru uzanırlar ve böylece nukleus ile flagellumu birleştirerek gelişmekte olan spermin bağlantı ya da boyun parçası olarak adlandırılan kısmı meydana gelir. Gelişmekte olan flagellumu sarmak için plazma membranı posteriyora doğru hareket ederken, mitokondiyonlar da boyun bölgesindeki fibrillerin etrafında ve posteriyor uzantısında heliks şeklinde sıkı bir kılıf meydana getirmek için göç ederler ve bu bölgeye orta parça denilmektedir. Esas parçanın dokuz longitudinal fiberini kuşatan ve hemen hemen flagellumun ucuna kadar uzanan, orta parçanın distalinde uzunlamasına iki sütun ve çok sayıda bağlantılardan oluşan yapıya fibröz kılıf denilmektedir. Aynı zamanda fibröz kılıfın distalinde kalan bu kısa segmentine son parça denilmektedir.

Olgunlaşma fazı; flagellanın etrafında yer alan fazla sitoplazma (rezidual cisimcik) azaltılarak olgun spermatozoon oluşmaktadır. Rezidual cisimcik sertoli hücreleri tarafından fagosit edilmektedir. Ayrıca seminifer tubül lumenine ulaşamayan spermler de sertoli hücreleri tarafından fagosit edilmektedir. Rezidual cisimcikler ve uzamış spermatidler inhibin, tubüller sıvı üretimini, androjen bağlayıcı protein ve 1 ve 6 interlökinlerin üretimini etkileyerek sertoli hücrelerinin sekretuar fonksiyonunu etkilerler. Spermin seminifer tubül lumenine salınmasına spermiyasyon denilmektedir. Spermiyasyon sürecinde Sertoli hücresi ve spermatid bağlantı kompleksleri ortadan kalkar. Spermin salı verilme hızı, ejakülattaki sperm hücrelerinin sayısını belirlemektedir. Bu süreç sıcaklıktan, toksik ajanlardan ve hormonal modifikasyonlardan etkilenebilmektedir (34,36,53).



Şekil- 6: spermin şematik görünümü (35) .

Matür (Olgun) Spermin Yapısı; matür insan spermi yaklaşık olarak 60µm uzunluğundadır. Yassı, sivri, 3 µm genişliğinde, 1 µm kalınlığında ve 4,5µm sperm başına sahiptir. akroozomal kep kısmı tripsin benzeri proteazlar olan, nöraminidaz, hyaloronidaz ve akrozin içermektedir. Sperm ve ovum temas ettiğinde akroozomal aktivite başlayarak ovumun zona pellusidasının delinmesi, spermin penetre olması, başka sperm girişi engellenerek fertilizasyon kolaylaştırılır.

Sperm; boyun, orta parça, esas parça ve son parçadan oluşan bir kuyruğa sahiptir. Boyun kısmı kısadır ve sentriyolleri ve kaba fibrillerin başlangıç kısmı burda yer almaktadır. Orta parça mitokondriyonları içermekte ve yaklaşık 7 µm uzunluğundadır. Mitokondriyonlar

kuyruk hareketi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Esas parça kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksinin dışındaki fibröz kılıfı içerir ve 40 µm uzunluğundadır. Son parça ise olgun spermde flagellumun son 5 µm'lik kısmını ve sadece aksonemla kompleksini içermektedir (Şekil-6) (35).

Spermatozoa daha sonra tubül lumenine salınır, böylece kadın üreme sisteminde tam kapasite elde edilmeden önce rete testis, efferent kanallar ve epididim yoluyla olgunlaşmaya devam eder (56). Sperm, bu aşamada hareketsizdir ve olgunlaşma sürecini tamamlamak için Sertoli hücrelerinde salınan sıvı ile birlikte seminifer tubüllerde lamina propriyanın kontraktıl hücrelerinin kasılmasıyla birlikte tubüllerden salınır. Öncelikle düz tubüllerden mediastinum testise ve burdan rete testise girer. Daha sonra boşaltım kanallarının başlangıcı olan duktuli efferentese burdan da duktuli epididimisin proksimal kısmına geçmiş olur (57). Bu kanal oldukça kıvrımlı ve 4-5 metre uzunluğunda olup spermin duktuli epididimisten geçişi sırasında sperm hareket kazanmaktadır. Aynı zamanda sperm, duktuli epididimis kanalında, nukleus DNA'sının yoğunlaşması ve baş boyutunun azalması, sitoplazmasının azaltılıp daha ince hale gelmesi, plazma membranının proteinlerinde, lipidlerinde değişimler ve glikozilasyon dış akrozomal membranda değişiklikler (dekapasitasyon) gibi farklılıklar meydana gelmektedir. İnsanda spermatogenez süresi yaklaşık 74 gün ve epididimisten geçiş süreci de yaklaşık 12 gün sürmekte olup toplam sperm üretim süresi yaklaşık 86 gün sürmektedir. Ayrıca insan testisinde günde yaklaşık 300 milyon sperm hücresi üretilmektedir (35).

3.2 Erkek İnfertilitesi

Tanım olarak infertilite, bir erkeğin bir yıl boyunca düzenli ve korumasız cinsel ilişki süresince doğurgan bir kadında gebeliğe neden olamayan verimsizliği olarak tanımlanmaktadır (58). Kısırlık, çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilemekte olup erkek faktör kısırlığının ise çiftlerin yaklaşık %50'sinde etkili olduğu düşünülmektedir (59,60). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, 1 ile 4 hafta arasında toplanan iki semen analizinin en az bir örneğinde sperm konsantrasyonu, motilitesi ve/veya morfolojisindeki değişikliğin, erkek faktörü infertilitesinin patogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (61).

Erkek fertilite bozukluğu, onkolojik, kardiyovasküler, otoimmün hastalıklar, diğer kronik hastalıklar ayrıca sigara, alkol, belirli kimyasallar, ağır metaller, böcek ilaçların, ısı ve elektromanyetik radyasyona maruz kalma gibi faktörlere bağlanmaktadır. Bu faktörlerin çoğunun sonucu da oksidatif strestir (62–64).

Serbest radikaller, biyomolekülleri oksidasyonla modifiye edebilen bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Bu moleküller oldukça reaktiftir ve yakınlarındaki hemen hemen her madde ile reaksiyona girer (65). Serbest radikaller, bir dış yörüngede tek eşlenmemiş elektrona sahip reaktif kimyasal türleridir. Bu kararsız konfigürasyon, protein, lipit, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi bitişik moleküller ile reaksiyonlar yoluyla enerji sağlar. Biyolojik sistemlere zarar veren serbest radikallerin çoğu oksijensiz radikallerdir (66). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) normal hücrel metabolizma sırasında üretilir. ROS ve RNS, yaşayan sistemlerin zararlı veya faydalı olabilecek rollere sahiptir (67). Sağlıklı erkeklerde, üreme sisteminde ROS ve antioksidanlar arasında hassas bir denge korunur (68). Oksidatif stres (OS), antioksidan savunma sistemi ROS'a karşı yetersiz hale geldiğinde gelişir, bu da hücrelere, dokulara ve organlara zarar verir (69).

Semendeki başlıca hücrel ROS kaynakları sperm hücreleri ve lökositlerdir. Erkek germ hücrelerinin gelişiminin ilk aşamalarından itibaren az miktarda ROS üretebilirler. ROS sperm kromatin yoğunlaşmasında rol oynar, apoptozun indüksiyonu veya spermatogoninin proliferasyonu ile germ hücre sayısını ayarlar (70). Olgun spermelerde ROS, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, mitokondriyal kılıf stabilitesi ve sperm motilitesinde önemli bir rol oynar. ROS ayrıca sinyal molekülleri (hücre sinyallemesinin ikinci habercileri) olarak da işlev görebilir. Üretimlerinin en az iki konumu ve mekanizması vardır. Bozulmuş morfolojisi olan, esas olarak olgunlaşmamışlıklarını ve doğurganlık potansiyellerini azaltan sitoplazmik kalıntıları olan sperm hücreleri, normal yapıya sahip spermatozoalara göre daha yüksek miktarda ROS üretir (71). Farklı olgunlaşma evresinde spermatozoa tarafından üretilen ROS miktarları arasında da bir fark vardır (72).

Lökositler tarafından çok yüksek miktarda ROS üretimi mevcuttur. Bu durum enfeksiyonlara ve inflamasyona karşı hücrel savunma mekanizmasında önemli bir rol

oyunar. Bu gibi durumlarda aktif lökositler, etkilenen organa, enfeksiyöz ajanların ortadan kaldırılmasına yol açan büyük miktarlarda ROS salgılayarak sızar. Bununla birlikte, oksidanlar ve antioksidanların bu dengesizliği hücrelere zarar verebilir. Spermada lökosit sayısındaki artış çevresel faktörlerin, uzun süreli cinsel yoksunluğun veya varikoselin bir sonucu da olabilir (73).

Spermatidler ve olgun spermatozoaların membranları oksitlenebilen (lipit peroksidasyon) doymamış lipitler bakımından zengindir bu sebeple ROS'un yüksek konsantrasyonlarda bulunması olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Lipid peroksidasyon işlemi, hücresel enzimlerin inaktivasyonuna, membran bütünlüğü kaybı ve geçirgenliğinde artışa, DNA hasarı ve hücre apoptozuna yol açtığı bilinmektedir. Bunun sonucu olarak da sperm sayı ve aktivitesinde azalma, motilitede azalma ve anormal morfoloji görülmektedir (74). Ayrıca diyabetin erkek üreme fonksiyonu üzerinde olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir (75).

Diyabetes Mellitus'da (DM) oldukça güçlü serbest radikallerin üretiminin arttığı ve bunu takiben gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) üretimi ve AGE için reseptör ekspresyonunda bir artış bildirilmiştir (76). Diyabette hiperglisemiden kaynaklı olarak mitokondri tarafından yüksek miktarda O₂ üretimi gliseralehit-3 fosfat dehidrojenaz aktivitesini önemli ölçüde inhibe eder ve bu durum yukarı akış glikolitik metabolitlerini yönlendirerek hiperglisemik hasarın artmış AGE üretimini aktive etmesine neden olur (77). AGE'ler, hiperglisemik koşullar altında şeker ile proteinler, lipidler ve DNA'nın amino grupları arasındaki enzimatik olmayan reaksiyonun ürünleridir (78). AGE'ler, ileri glikolize son ürünler (RAGE) için reseptörleri aktive ederek bağımsız olarak veya dolaylı olarak ROS oluşturarak makromoleküllerin normal işleyişini doğrudan değiştirebilir. Ayrıca seminal antioksidan savunma yeteneğini, artmış ROS üretimi ile başa çıkamaz. Bu durumdan kaynaklı olarak sperm DNA hasarına ve mitokondriyal DNA fragmentasyonuna, daha sonra değişen sperm parametrelerine ve ardından erkek kısırlığına sebep olacak birçok reaksiyon dizisine yol açmaktadır (79). Aynı zamanda bu durumdan kaynaklı olarak AGE'lerin lipid peroksidasyon seviyelerini tetiklediği düşünülmektedir (80).

Kısaca AGE ve OS'nin zararlı etkilerinin erkeklerdeki infertilite üzerinde olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir.

3.3 Diyabet

3.3.1 Tarihçesi

Diabetes mellitus, eski çağlardan beri bilinen bir hastalıktır. Bilinen tarihiyle milattan önce (MÖ) 1500'lerde Mısır papirüslerinde ve yine M.Ö. Hint uygarlığında da bu hastalığın aşırı idrara çıkma ile ilişkilendirilmiş ve idrarlara aşırı böcek konmasından kaynaklı tatlı olduğu düşünülmüştür. Diabetes Mellitus adını Yunancadan almıştır. Yunanca akıp gitmek anlamından diabetes, bal gibi tatlı anlamında da mellitus kelimelerinden köken alarak Diabetes Mellitus türemiştir (81–83). İdrarda glukozun keşfedilmesinden sonra 19. yüzyılda Paul Langerhans'ın pankreasta hücre topluluklarını olan langerhans adacıklarını keşfetmesiyle ilerleyen yıllarda pankreas bezinin endokrin fonksiyonu ve öneminin keşfedilmiştir. 20. yüzyılda pankreas ile diyabet hastalığı ilişkisi üzerine araştırmalar artmıştır. 1921 yılında Toronto Üniversitesinde bir grup araştırmacı insülini izole etmeyi başarmış ve deneysel olarak çalışmalar başlamış olup tedavi yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır (82).

3.3.2 Tanımı

Diabetes Mellitus (DM), kalıtsal ve çevresel etmenler ile ortaya çıkan hiperglisemi ile ilişkili ve kısmi veya toplam insülin yetersizliğinin neden olduğu bir dizi metabolik durumun meydana gelmesiyle karakterizedir (84). Aynı zamanda DM, endokrin sisteminin kronik bir metabolik bozukluğudur ve dünya çapında yaygınlığı hızla artmaktadır Diyabet gelişiminde çeşitli patojenik süreçler yer alır. Bunlar, pankreatik hücrelerin, insülin eksikliğine bağlı otoimmün yıkımından insülin etkisine dirençle sonuçlanan anormalliklere kadar değişir (75). Her geçen gün bu hastalıktan muzdarip olan insanların sayısı artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'na göre; 2010'dan bu yana dünyada 300 milyon kişiye diyabet teşhisi konulmuş olup hasta sayısının 2030 yılına kadar 500 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca DM'nin karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını olumsuz etkileyerek, doku ve organlarda istenmeyen biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir. DM, insan ve

hayvanların her iki cinsiyetinde de retina, kalp, böbrek, sinir ve üreme sisteminin çeşitli organlarında komplikasyonlara neden olmaktadır. Uzun dönemde bu organlarda meydana gelen hasarın, disfonksiyon ve yetmezlik, morbidite ve mortalite artışına neden olduğu bilinmektedir (77,85).

3.3.3 Sınıflandırılması

Diyabetes Mellitus'un, sınıflandırılması araştırmaların ışığında değişimler göstermiştir. Günümüzde DM'un başlıca dört tipi bildirilmiştir, bunlar; Tip 1 diyabetes mellitus, Tip 2 diyabetes mellitus, Gestasyonel diyabetes mellitus ve Spesifik diyabetes mellitus olarak sınıflandırılmıştır (86).

3.3.3.1 Tip 1 diyabetes mellitus

Daha önce insüline bağımlı diyabet veya juvenile onset diyabet terimlerinin kapsadığı diyabetli hastaların sadece % 5-10'unu oluşturan bu diyabet formu, pankreasın β -hücrelerinin hücresel aracılı otoimmün yıkımından kaynaklanır. β -hücresini bağışıklık tahribatının belirleyicileri arasında adacık hücresi otoantikorları, insüline otoantikorlar, GAD'a (glutamik asit dekarboksilaz) otoantikorlar (GAD65) ve tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2b'ye otoantikorlar bulunur. Açlık hiperglisemi başlangıçta tespit edildiğinde, bu otoantikorlardan biri ve genellikle daha fazlası bireylerin % 85-90'ında bulunur. Hperglisemi ve ketoasidozu önlemek ve hastanın hayatına devam etmesini sağlamak için insülin tedavisi gerekmektedir (84,87).

3.3.3.2 Tip 2 diyabetes mellitus

Tip 2 diyabet, “insüline bağımlı olmayan diyabet” veya “yetişkinlerde başlayan diyabet” olarakta adlandırılmakta olup tüm diyabetlerin % 90-95'ini oluşturmaktadır. β -hücresi disfonksiyonu ve değişen derecelerde insülin direnci ile ilişkili karmaşık bir metabolik bozukluktur. Bu bireylerin, başlangıçta veya yaşamları boyunca insülin tedavisine ihtiyacı olmayabilir. Tip 2 diyabetin birçok nedenin olduğu bilinmektedir. Spesifik etiyolojiler bilinmemekte olup β hücrelerinin otoimmün yıkımı gelişmez. Ayrıca hastalarda bilinen diğer diyabet nedenlerinden hiçbirisi yoktur. Tip 2 diyabetli bireylerin çoğunluğu fazla kilolu ya obez olduğu belirtilmiştir. Olması gerekenden daha fazla kiloya sahip olmanın insülin

direncine sebep olduğu belinmektedir. Ayrıca bilinen kilo ölçütlerine göre aşırı kilo problem olmayan hastaların karın bölgelerinde ağırlık artışı olduğu ve vücut yağ yüzdesi artabilmektedir. İnsülin direnci ayrıca hipertansiyon ve polikistik over sendromu gibi diğer metabolik durumlarda da bulunur ve bunlar tip 2 diyabetli bireylerde birlikte bulunabilir (88,89).

3.3.3.3 Gestasyonel diyabetes mellitus

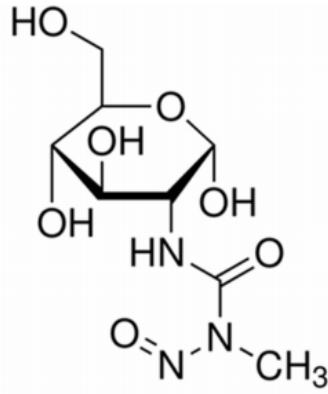
Gestasyonel diyabetes mellitus, muhtemelen gebelik öncesi diyabeti olan kadınlar hariç, hamilelik sırasında başlangıç veya ilk tanıma ile karbonhidrat intoleransı olarak tanımlanır. Gebeliğin yaygın bir tıbbi komplikasyonudur ve olumsuz sonuçlarda bir artış ile ilişkilidir. Doğumdan sonra düzelebilmekte ya da etkilenen kadınlarda doğum sonrası kalıcı diyabet oluşabilmektedir (90).

3.3.3.4 Spesifik diyabetes mellitus

Diyabetes mellitus'un spesifik diabetes mellitus formu β hücreleri ve insülinde genetik hasar, ekzokrin pankreasta hasar oluşumu, endokrinopati, ilaç ve kimyasal aracılı, enfeksiyon aracılı, bağışıklık aracılı formun yaygın olmayan hali ve diyabetle ilişkilendirilen diğer genetik sendromlardan kaynaklanan diyabetes mellitus olarak sınıflandırılmaktadır (75,91).

3.3.4 Streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturma

Deneysel hayvan modelleri, çeşitli hastalıklardan korunma, hastalıkların patogenezinin anlaşılması ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için kullanımı yaygın bir modeldir. Deneysel hayvan modelleri oluşturmak için birçok yöntem kullanılmaktadır. Streptozotosin yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Streptomyces achromogenes elde edilen, antibiyotik olarak kullanılan ve diyabetojenik özelliği olan streptozotosin (STZ) deneysel diyabet oluşturmada kullanılan kimyasallardan biridir. STZ (2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoüredio)-D-Glikopiranoz) kapalı formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ 'dir (Şekil-7) (92).



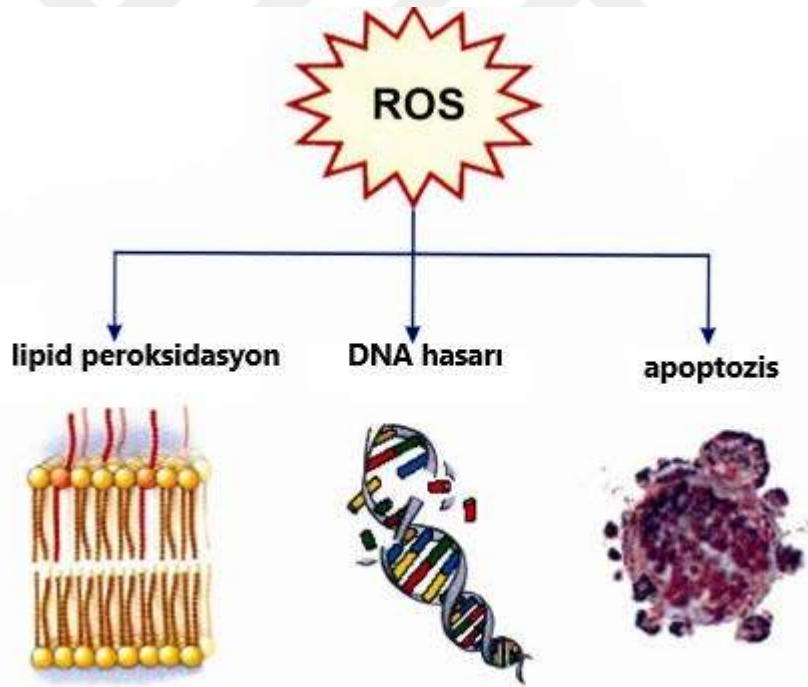
Streptozotosin (STZ)

Şekil- 7: STZ yapısı (93).

Streptozotosin, pankreas β -hücrelerinde hasara yol açar ve hem insüline bağımlı hem de insüliniden bağımsız diyabete sebep olmaktadır (94). Streptozotosin, yapısında glukoz molekülü ihtiva ederek pankreatik beta hücre membranında bulunan glukoz transport proteini 2 (GLUT 2) aracılığı ile beta hücreleri içine alınır (92). Streptozotosinin meydana getirdiği ilk etkinin beta hücrelerinin glukozu yanıtını ortadan kaldırmak olduğu belirtilmiştir (95) ve bu olayı kalıcı beta hücre hasarı ve kaybı izlemektedir. İlaç, hücre içine alındıktan sonra reaktif nitrojen radikallerine sebep olur bu durumda DNA hasarı ve ilacın alkilleyici etkisi ile hücrede meydana gelen kalıcı hasar ile oluşmaktadır (94,96). STZ, β -hücrelerinin kalıcı hasarı ve kaybıyla kan glukoz seviyesindeki artış ve insulin seviyesindeki azalmanın meydana getirdiği hiperglisemiyle insülinin sekresyon ve biyosentezine engel olmaktadır (97). STZ ile diyabet indüksiyonunda; yapılan ilk STZ enjeksiyonuyla ilk saatte insulin sekresyonu durur ve karaciğerde glikojen yıkımı meydana gelir bununla birlikte geçici hiperglisemi görülür ve iki ile dört saat arasında sürer. Ardından insülin salgılayan pankreatik β -hücrelerinde nekroz görülür ve kandaki insulin seviyesi yükselir. STZ enjeksiyonundan yaklaşık iki gün sonra kanda yüksek düzeyde insülin seviyesinde ani düşüş oluşur ve böylece kalıcı hiperglisemi meydana gelir. Kalıcı hiperglisemi meydana geldikten sonraki günlerde deneysel diyabetin sebep olduğu semptom ve komplikasyonlar görülmeye başlamaktadır (97,98).

3.3.5 Diyabet ve erkek fertilité ilişkisi

Diyabet ile ilgili yapılan çalışmalarda, erkek genital sistem üzerinde komplikasyonlar meydana getirerek fertilitéyi etkilediği bilinmektedir. DM'nin testis dokusunda yol açtığı bilinen komplikasyonları, seminal sıvı ve lipoperoksidasyonda artan oksidatif stres ile artan reaktif oksijen türü (ROS) retimi, sperm DNA fragmantasyonu, sperm mitokondriyal biyoenerji değişimi ve enzimatik glikasyon son ürünleridir (99,100). Bu komplikasyonlar da sperm hasarına yol açmaktadır. DM, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salınımını etkileyerek, spermatogenik seri hücrelerini ve sperm hücrelerini negatif yönde etkilemektedir (101). Ayrıca diyabet, reaktif oksijen ürün üretimine ve serbest radikallerin artmasına sebep olmaktadır. Bu durumda doku hasarına ve apoptozise yol açarak sperm hasarı ile sonuçlanmaktadır (102).



şekil- 8: Testis zerinde ROS etkisi şematik görünümü (103).

Aynı zamanda erkek aksesuar bezi inflamasyonuna yol açarak erektil ve ejakülatör disfonksiyona sebep olduğu belirtilmiştir (104,105). Tip 1 DM'li testislerin daha düşük sperm parametrelerine sahip olduğu semen konsantrasyonu, sperm motilitesi ve morfolojisinin kötü olduğunu gösterilmiştir (106,107). Diyabetik sıçan testislerinde,

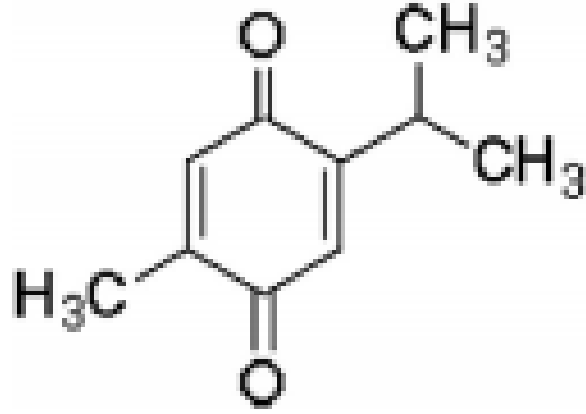
testosteron, LH ve insülin reseptörlerinin azalmasından kaynaklı Leydig hücrelerinin işlevinde bozukluk olduğu ve böylece üreme fonksiyonunu negatif etkilediği belirtilmiştir (108).

Morfolojik olarak diyabetik erkeklerde endokrin bozuklukları, diyabetik nöropati ve oksidatif stres etkisi ile birçok değişiklik gözlenmektedir. Artmış interstisyel stroma, seminifer tubül çapı ve lumen boyutunda azalma, germinal epitelde ve spermatogenik hücrelerde düzensizlik, sperm sayısında azalma ve yapısal değişiklikler, apoptozis ve Leydig hücrelerinde azalma gibi değişiklikler olduğu belirtilmiştir (109–112).

3.4 Çörek otu yağı

3.4.1 Çörek otu yağı'nın genel özellikleri

Çörek otu bitkisi, Ranunculaceae ailesine ait bir bitki olup *Nigella sativa*, siyah tohum ve Habbat-uL-Sauda olarak da isimlendirilmektedir (113). Eski Mısır, Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Güneybatı Asya'ya özgü olan ve yıllık çiçekli bir bitkidir. Siyah tohumlara sahiptir. Tohumları bitkinin aktif bileşenlerini içermektedir (114). Çörek otu bitkisi, zengin bir tarihe ve kültürel mirasa sahip mucizevi bir bitki olarak adlandırılmaktadır (115). Kullanımı eski Mısır ve Yunan dönemine kadar dayanmaktadır. Çeşitli hastalıkların tedavisinde ve sağlığı korumak amaçlı kullanılmıştır (114). Çörek otu eski zamanlardan beri, baş ağrısı, diş ağrısı, burun tıkanıklığı, astım, bronşit, enfeksiyonlar, egzama, parazit, emziren süt üretimini artırma, hipertansiyon, romatizmal hastalıklar, karaciğer toksisitesi, gastrointestinal problemler ve bağışıklık sistemini güçlendirmek gibi birçok durumda kullanılan geleneksel bir bitkidir (116–118). Çörek otu yağı, timokinon (Şekil-9), ditimokinon, timohidrokinon ve timol gibi birçok bileşik içermektedir. İçeriğinde en yüksek oranda timokinon bileşiği (%30-%48) içermektedir. Ayrıca flavonoidler, alkaloidler, antosiyaninler, linoleik ve oleik asitler gibi esansiyel yağ asitleri içermektedir (119).



Şekil- 9: Timokinon Yapısı (120).

İnsanlığın evriminin ilk zamanlarından beri bitkilerin ilaç olarak kullanımı mevcuttur. Günümüzde de çörek otu ile yapılan çalışmalarda antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, antikanser, antihipertansif ve antidiyabetik gibi birçok etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (121).

3.4.2 Çörek otu yağı ve anti-diyabet ilişkisi

Diyabetin antioksidan savunma sisteminin aktivitesini azalttığı ve kronik hipergliseminin serbest radikal hasarının artmasına yol açtığı bilinmektedir (122). Aynı zamanda çörek otunun antidiyabetik özelliklere sahip proteinlerin hücre alımını etkileyen AMPK aktivasyonu ile indüklendiği ve bu şekilde de insülin duyarlaştırıcı bir etkiye yol açtığı belirtilmiştir (123,124). Ayrıca çörek otunun antioksidan etkisiyle pankreasta β -hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğu belirtilmiştir (125). Yapılan birçok çalışmada Çörek otu yağının ve özünün kan şekeri düşürdüğü ve insülin düzeylerini düzelttiği gösterilmiştir (126,127).

Çörek otunun diyabet üzerinde karaciğer aktivitesini düzenleyerek glukogenezde yer alan glikoz 6-fosfataz ve fruktoz 1.6 bisfosfataz aktivitesini inhibe ederek glukoneogenez azalttığı belirtilmiştir (120).

3.4.3 Çörek otu yağı ve erkek fertilité ilişkisi

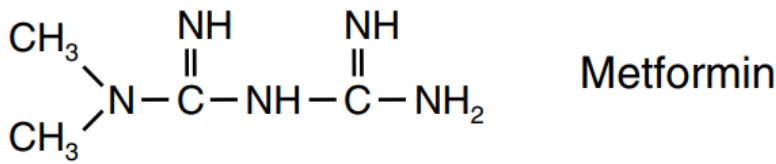
Çörek otu tohumunun erkek üreme organlarının ağırlığını, leydig ve sertoli hücre sayısını, sperm sayısı, motilitesi ve canlılığını arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca hipofiz bezini etkileyerek erkek üreme hormonlarını pozitif yönde düzenlediği ve doğurganlık potansiyelini arttırdığı belirtilmiştir (128). Çörek otunun, oksidatif fosforilasyon enzimlerini etkileyebileceğini ve sperm hareketliliğini artırabileceği görülmüştür (129). Diyabet gibi bazı kronik hastalıklar üreme sistemi üzerinde yükselen ROS seviyesi ve hasarlı hücre artışına sebep olmaktadır (76). Çörek otun diyabetik erkek sıçanlarda testosteron seviyelerini ve testis dokusunu, semen miktarını pozitif yönde geliştirdiği ayrıca kan şekeri ve stres parametreleri olan lipid peroksidasyon ürünleri seviyesi katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutazı azalttığı belirtilmiştir (130).

Birçok çalışmada en iyi sonuçları almak için çörek otu yağının infertilite modellerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Çörek otu yağının terapötik kullanım için en iyi çörek otu formu olduğu görülmektedir (131).

3.5 Metformin

3.5.1 Metformin'nin genel özellikleri

Metformin (1,1-dimetilbiguanid) molekül formülü $C_4H_{11}N_5$ olup (Şekil-10) (132), günümüzde diyabet tedavisinde kullanılan çok yaygın anti-hiperglisemik bir ilaçtır. Metformin, *Galga officinalis*'den (Fransız leylak) bir guanidin türevi olan galegine ile ilişkili biguanid antidiyabetik bileşik ailesine aittir (133–135).



Şekil- 10: Metformin yapısı (136).

Galla officinalis'in tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Onyedinci yüzyılda ateşe ve epilepsiye faydalı olduğu belirtilmiştir. Onsekizinci yüzyılda da sık idrara çıkma ve

susuzluk gibi durumların tedavisinde 1900'lere gelindiğinde, *Galga officinalis*'te bulunan aktif moleküllerin kimyasal bir çalışması, diyabetik hastalarda anti-hiperglisemik özellikleri olduğu belirtilmiş olup günümüzde diyabetik hastalarda yoğun olarak kullanılan bir ilaç olup (137), diyabetten kaynaklı oluşan komplikasyonlar üzerinde de metforminin olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (138). Ayrıca metforminin hiperglisemi ilişkili olan endotel bağımlı fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres ve DNA hasarını üzerinde azaltıcı etkilerinin olduğunu belirtilmiştir (132). Metformin, periferik glukoz alımında ve doku insülin duyarlılığında iyileşme ile hepatik glukoneogenez ve bağırsak glukoz emiliminde azalmayı sağlayarak glisemiye azalttığı bildirilmiştir. Karaciğer, kas, yağ dokusu, pankreas, hipofiz, hipotalamus ve gonadlar gibi çok sayıda dokuya ulaşmaktadır (139).

Hücre membranı boyunca glukoz taşınmasına, bir transmembran polipeptid grubuna ait olan spesifik glikoz taşıyıcıları (Dependent Upon Glucose Transporter-GLUT) aracılık eder. Kas ve yağ hücrelerinde iki form tespit edilmiştir: ağırlıklı olarak plazma zarında bulunan GLUT-I ve esas olarak hücre içi zarlarda bulunan GLUT-4. İnsülinin, bu taşıyıcıların hücrenin plazma zarına göç etmesine neden oluyor gibi görünmektedir ve ayrıca bunların içsel aktivitesini artırabildiği bilinmektedir (140).

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda, metforminin glukoz taşıyıcılarda (GLUT) değişiklik yaparak, mitokondriyal solunum zincirini inhibe ederek adenozin monofosfatla aktif protein kinaz (AMPK) aktivitesini arttırmaktadır. AMPK, hücresel enerji homeostazını koruyan kritik bir hücresel enerji sensörü olarak görev yapmaktadır. Bu inhibisyon, ATP üretiminde azalmaya yol açarak AMPK aktivasyonunda artış meydana gelir. Böylece hücre içi enerji dengesini sağlar (139,141,142). Bu durumda AMPK, glukoz ve lipid katabolizması gibi enerji üreten katabolik yollara başlatır. Aynı zamanda yağ asidi, kolesterol ve protein sentezi gibi işlemlerin inhibisyonuna yol açarak enerji tüketimi azaltır (143).

Böylece metformin, diyabetten kaynaklı AGE oluşunu azaltarak (144) oksidatif stres artışını azaltır ve lipid peroksidasyonunu da engellemiş olduğu bilinmektedir (145). Aynı

zamanda hiperglisemi kaynaklı endotel bağımlı fonksiyon bozukluğu ve DNA hasarında da azaltıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir (132).

3.5.2 Metformin ve erkek fertilité ilişkisi

Diyabetin, erkek üreme sistemi üzerinde spermatogenez, steroidogenez, erektil disfonksiyon veya retrograd ejakülasyon, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi üzerinde olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir (146–148). Aktif sentez yapan hücelere sahip olan erkek üreme sistemi dokuları enerji mekanizmalarından etkilenmektedir. Bazı çalışmalarda, metforminin, oksidatif metabolizmada bir azalmaya ve dolayısıyla anaerobik solunum ve laktat sekresyonunda bir artışa yol açan mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks I'in bir inhibitörü olarak görev yaptığını belirtilmiştir (149,150). Testis iskemisinin (stresle tetiklenen apoptoz) bir modelinde, metformin ön tedavisi hem oksidatif stresi hem de germ hücrelerinin kaybını azaltarak sperm üretimi üzerindeki hasarı sınırlandırarak metforminin sitoprotektif etkileri olduğunu düşündürmektedir (151).

Metforminin testislerde spermatogenezi ve steroidogenezi kısmen AMPK yolu ile etkilemesi mümkündür. Sıçan kültürlenmiş Sertoli hücrelerinde metformin tarafından AMPK aktivasyonunun, LDH (laktat dehidrojenaz) aktivitesinde değışiklik olmaksızın laktat üretiminde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, MCT4 (monokarboksilat taşıyıcı 4), GLUT1, GLUT3 ekspresyonunda bir azalma ve alanin ve asetat konsantrasyonlarında bir artış da bildirilmiştir (152), bu da mitokondriyal biyoenerjetikte eşzamanlı bir artış olmaksızın glikoliz aktivasyonunu düşündürmektedir (153).

Sertoli hücresi, germ hücreleri geliştirmek için tercih edilen enerji substratı olan laktatı sentezlemektedir. Metforminin etkisi ile mitokondriyal solunum zincirinin inhibe edilmesinden kaynaklı laktat sekresyonunda bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum anti-apoptotik bir etkiye sahip olmakla birlikte spermatogenez ve erkek üreme fonksiyonu için pozitif bir etkiye sahip olabilir (150,152,154). Ayrıca erektil disfonksiyon gözlenen diyabetik erkek bireylerde endotelial nitrik oksit sentaz fosforilasyonu azaldığı fakat

metformin kullanımında endotelial nitrik oksit sentaz fosforilasyonunun arttığı bildirilmiştir (155).

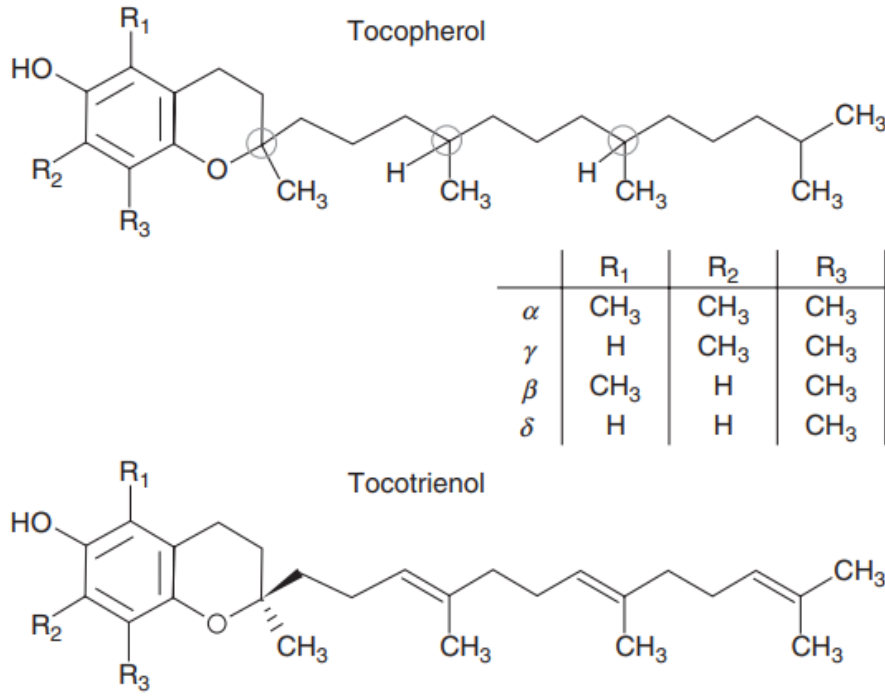
Metforminin diyabetik erkek üreme sistemi üzerinde sperm motilitesi, morfolojisi, erektil disfonksiyon, spermatogenez ve testosteron seviyelerinde iyileşme gösterdiğine dair literatürler mevcuttur (156).

3.6 Vitamin E

3.6.1 Vitamin E'nin genel özellikleri

Vitamin E (α -tokoferol) esas olarak hücre zarlarında lokalize olan yağ ve alkol gibi çözücülerde çözünen organik bir kimyasal bileşiktir (157). Herbert M. Evans ve Katherine S. Bishop adlı araştırmacılar, sıçan üremesi için gerekli olan lipit ekstraktında “faktör X” adlı bir molekül keşfettiler (158). 1924'te Barnett Sure (2) tarafından “faktör X” E vitamini olarak adlandırıldı (159). Ratlara bu bileşik verildiğinde üreme performansını arttığı için, Evans bu bileşiğe (tokos = doğurmak, phero = taşımak ve bileşiğin bir alkol olması nedeniyle ‘ol’) ‘tokoferol’ adını vermiştir (160).

Doğal olarak oluşan vitamin E formları, α -, β -, γ - ve δ -tokoferol (α T, β T, γ T, δ T) ve α -, β -, γ - ve δ -tokotrienol (α TE, β TE, γ TE, δ TE) içeren sekiz lipofilik moleküldür. Tüm E vitamini formlarında bir kromanol halkası ve bir 16-karbon fitil yan zinciri vardır, bu tokoferoller doymuştur ve tokotrienollerin üç çift bağı vardır (161). Bu bileşikler molekülün kromonal halkasındaki metil gruplarının konumlarına ve sayına göre adlandırılmaktadır (Şekil-11) (162,163).



Şekil- 11: Vitamin E'nin yapısı. Tokoferollerin ve tokotrienollerin yapıları. Daireler tokoferolde 2', 4', 8' olmak üzere kiral stereo merkezler (164).

İnsanlarda bu yağda çözünen vitaminin en aktif formu, ana diyet kaynakları bitkisel yağlar, fındık ve yeşil yapraklı sebzeler olan güçlü bir biyolojik antioksidan olan alfa-tokoferoldür (165). Ayrıca vitamin E formları içerisinde en yaygın olanı α -tokoferoldür (163). Sellüler ve subsellüler membranlardaki fosfolipidlerin, alfa-tokoferole karşı afiniteleri yüksektir. Bu membranlarda vitamin E süperoksit ve hidroksil radikalini, singlet oksijeni, lipid peroksidlerini ve diğer radikalleri daha az aktif formlara dönüştürerek, membranları lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan özelliği ile koruma mekanizmasına sahip olduğu ve hücre membran değişikliklerini önlediği bilinmektedir (166,167). Kolay oksitlenebilme yeteneğine sahip olan α -tokoferol, oksijeni bağlayarak oksidasyona duyarlı moleküllerin oksidasyondan korunmasını ve oksidasyonun azaltılmasını sağlayarak oluşabilecek hasarların engellenmesini sağlamaktadır (168,169).

Anı zamanda vitamin E, bir fenolik hidrojen atomunu peroksit radikaline transfer edip lipid peroksit radikalini yok ederek de lipid peroksidasyon reaksiyonlarını sona erdirmektedir. Bu özelliğinden dolayı zincir kırıcı antioksidan olarak da adlandırılmaktadır (170). İnce

bağırsakta, tokoferoller ve tokotrienoller emilir ve triasilgliserol, fosfolipidler ve kolesterol ile birlikte şilomikronlarla taşınır (171,172). Şilomikrona bağlı E vitamini formları, lenfatik sistem yoluyla lipoproteinler ile periferik dokulara taşınmaktadır (161,172). Günlük E vitamini ihtiyacının sağlıklı bir birey için 10-12 mg olduğu bilinmektedir. Vitamin E eksikliğine bağlı olarak lipid peroksidasyonunun hücresel hasarlara yol açtığı kabul edilmektedir (173).

3.6.2 Vitamin E ve anti- diyabet ilişkisi

Diyabetes mellitus, artan oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı çok yönlü bir metabolik bozukluktur. Birçok çalışma, diyabetes mellitus'un (tip 1 ve 2) serbest radikallerin artması ve antioksidan potansiyelinin azalması ile ilişkili olduğunu ve hücre bileşenlerinin oksidatif hasarına yol açtığını göstermiştir (174). Diyabette, hipergliseminin neden olduğu oksidatif doku hasarında yer alan önemli moleküler mekanizmayı hızlandıran mitokondriyal ve mitokondriyal olmayan kökenler de dahil olmak üzere birçok ROS üretimi kaynağı vardır (175). Hiperglisemi, serbest radikal üretimini en az üç farklı mekanizma ile artırır: enzimatik olmayan glikasyon, glikozun oto-oksidasyonu ve poliol yolunun hücre içi aktivasyonu mekanizmalarıdır. Yapılan çalışmalar, diyabetik deneklerde endotelial disfonksiyonun başlaması ve ilerlemesi için önemli bir mekanizma olarak oksidanların ve diğer reaktif ara maddelerin üretiminde hipergliseminin neden olduğu bir artışa işaret etmektedir (176).

Oksidatif stres ve glisemik düzenleme arasındaki ilişki halen tartışılmaktadır. Vitamin E oldukça etkili bir lipofilik antioksidandır. E vitamini, diasilgliserol kinazın etkisini uyarır ve diyabetik hastalarda fosfatidat fosfohidrolazı inhibe eder; bunun net etkisi azaltılmış diasilgliserol aktivitesi ve bunun sonucu da protein kinaz C (PKC) aktivasyonudur; bunun PKC'ye bağımlı mekanizmalar aracılığıyla iskelet kası insülin duyarlılığını azaltan serbest yağ asitlerinin olumsuz etkisini engellemesi beklenmektedir (177).

Prospektif kohort çalışmalarının incelendiği bir meta-analiz çalışmasında E vitamini tüketiminin Tip 2 diyabet riskinde % 13 azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (178). Bir diğer çalışmada ise Tip 2 diyabet hastalarında E vitamini düzeylerinin referans aralıkların

altında olduğu bulunmuştur. Ayrıca yüksek doz vitamin E'nin, hem insüline bağımlı hem de insüline bağımlı olmayan diyabet hastalarında glikat hemoglobini azalttığı bulunmuştur (179,180).

3.6.3 Vitamin E ve erkek fertilite ilişkisi

Antioksidanlar, serbest radikal kaynaklı infertiliteye karşı en önemli savunmadır. Oksidatif hasar spermatogenezi etkiler ve sperm fonksiyonunu bozabilmektedir. Ayrıca infertil erkeklerde hasarlı sperm fonksiyonu, lipid oksidasyonu ve spermatozoadaki antioksidan enzimlerin işlev bozukluğu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (181).

Artan ROS, sperm zarlarını ve DNA'sını değiştirerek erkek fertilitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bir spermin zarları hasar gördüğünde, hem hareketlilik hem de oosit zarını parçalama yeteneği tehlikeye girmektedir. Spermatozoal DNA bütünlüğü döllenme ve embriyo büyümesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (182,183). E vitamininin uygulanması sperm motilitesi üzerinde gelişmiş bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (184). Vitamin E dokulardaki antioksidan sistemlerde serbest radikalleri temizleyen önemli bir maddedir (165). Bu özelliklerinden dolayı vitamin E eksikliğinin üreme sistemlerinde bozukluk oluşturabileceği bildirilmiştir. Erkeklerde testiküler ve seminifer tubüllerin dejenerasyonu, testis atrofisi, spermatogenezis yetersizliği ve hücre apoptozu gibi hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca yapılan bazı hayvan çalışmalarında vitamin E'nin leydig hücrelerini etkilediği ve steroidjenik etkinliği arttırdığı bildirilmiştir (185,186) .

İn vitro çalışmalar, vitamin E'nin spermin hareketliliğinde değişiklik oluşturduğu ve hamster yumurta penetrasyon testinde dölleme yeteneklerini geliştirdiğini gösterilmiştir (187).

İn vivo çalışmalar, erkek infertilitesinde, vitamin E desteğinin, oksidatif stresin neden olduğu sperm hücre sayısının ve motilitesinin azaldığı durumlarda etkili olduğunu (184) ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehitin (MDA) azaltılarak sperm üretimini ve sperm hareketliliğini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (188).

Semen preparatında bir antioksidan olan E vitamini kullanımının ROS seviyelerini azalttığı ve sperm hareketliliğinin azalmasını önlediği gösterilmiştir (188).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, vitamin E kullanımının oksidatif stresli erkeklerde infertilite tedavisinde etkili olabileceği bildirmiştir (189). Oral vitamin E'nin, spermatozoal motiliteyi önemli ölçüde arttırdığı ve hastanın eşinde hamilelik olasılığını artırabileceği belirtilmiştir (190).

3.7 Apoptozis

Apoptozis kelimesi yunanca kökenli olup ilk olarak 1972 tarihli bir makalede Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü türünü tanımlamak için kullanılmıştır (191). Apoptoz, bir hücrenin büyümesini ve bölünmesini durdurduğu ve bunun yerine, içeriğini çevreleyen ortama dökülmeden hücrenin kontrollü ölümüyle sonuçlanan bir sürece girdiği süreçtir. Programlanmış hücre ölümü olarak da tanımlanmaktadır (192).

Apoptozis; genler tarafından düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan (ATP) bir olay olup hücrelerin inflamasyon olmaksızın kendi kendini ortadan kaldırdığı bir süreçtir. Ayrıca organizmada homeostazı koruyan bir mekanizmadır. Apoptozisin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Fakat hücrelerin hafızalarında genetik olarak var olan intihar programının çeşitli sinyaller ile patofizyolojik koşullar ve oksidatif stres gibi durumlarda aktifleşerek başladığı bilinmektedir (193,194). Apoptozis; embriyogenez, gelişme, tamir ve yenilenme olaylarında, homeostazis, organların büyüklüklerinin korunmasında ve patofizyolojisinde oldukça önemlidir (195,196).

Programlanmış hücre ölümü; büyüme hormon eksikliği, hücre yaşlanması, antineoplastik ilaçlar, insan bağışıklık eksikliği virüsü (Human Immunodeficiency Virus – HIV), radyasyon, tümör hücreleri, yüksek glukokortikoid düzeyi, ölüm reseptörü ailesine ait bir membran proteini olan Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) reseptör aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler ve oksidatif stres gibi durumlardan kaynaklı olarak gerçekleştiği bilinmektedir (192).

Apoptozisin olması gerektiğinden fazla veya az olması ve olmaması gerekirken olması gibi durumlarda apoptozis organizma için tehlike teşkil etmektedir (197). Morfolojik olarak apoptoziste, normal durumlarda bir hücrede art arda 7 kırımla onarıma gider fakat apoptoziste çok daha fazla kırılma oluşmasından dolayı hücrede onarım gerçekleşemez. Böylece hücre küçülmeye gider ve hücre membranı intakttır fakat membranda blebler oluşumu görülmektedir. Aynı zamanda kromatin nükleer membran çevresinde toplanır ve yoğunlaşarak piknotik bir görünüme sahip olur. Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından fagosit edilir. Morfolojik olarak apoptozisin sonunda hücre organelleri membran ile kaplı küçük apoptotik cisimciklere dönüşmektedir. Böylece ışık mikroskopik incelemede apoptotik hücreler çevresinde açık ve parlak alanlar şeklinde belirlenmektedir (192,194). Apoptozis bir grup sistein proteazlar olan kaspazların aktivasyonu ve hücrelerdeki başlangıç uyarılara bağlı olarak kompleks ve düzenlenmiş kaskat olaylarını kapsayan enerjiye gereksinim duyan bir mekanizmaya sahiptir (198).

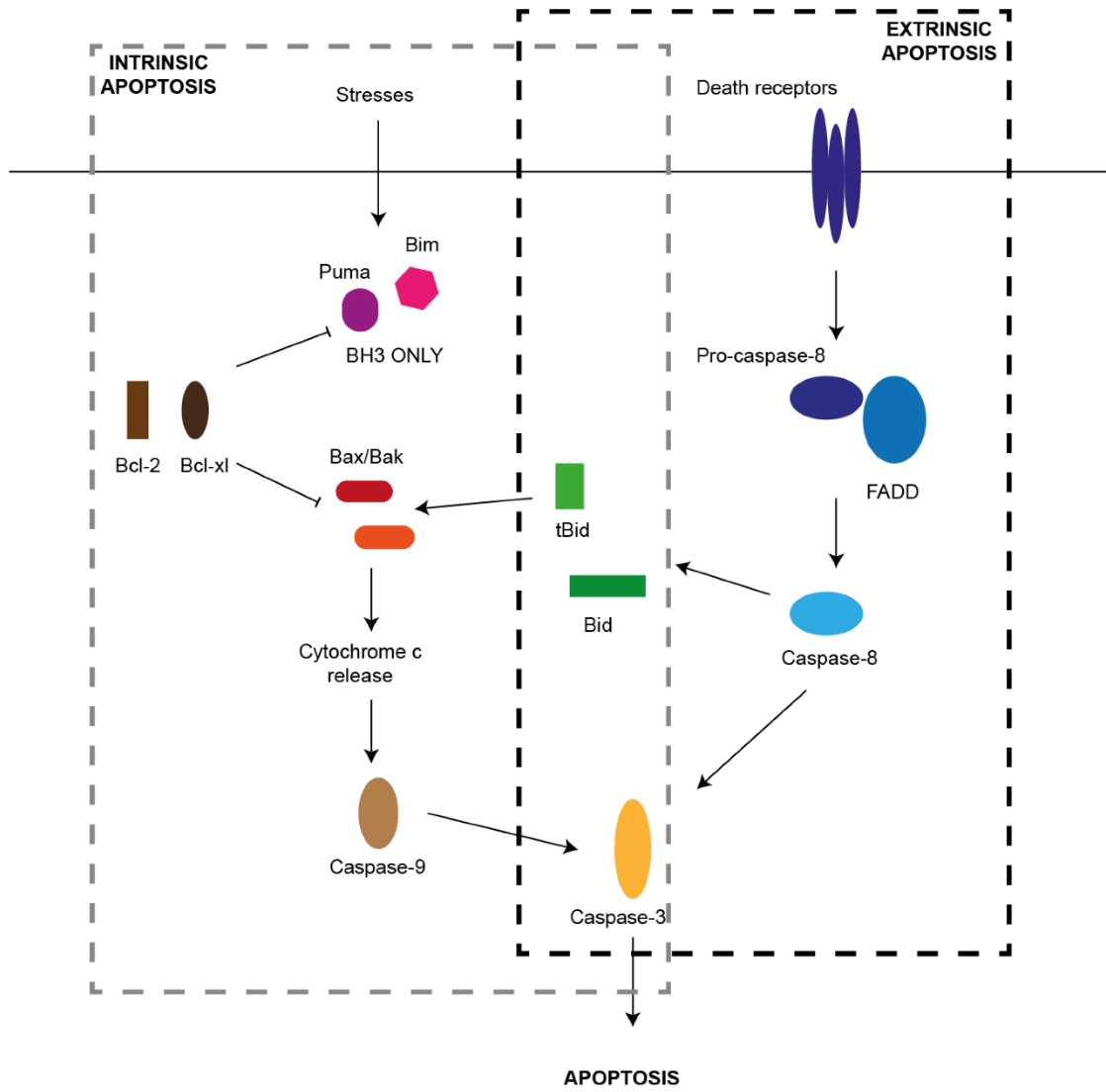
Apoptotik yollar metabolik ve hipoksik stres ile tetiklenen mitokondrial yolağa ya da intrinsik (iç) yolağa ve ölüm ligandları olarak bilinen Fas-L ya da tümör nekroz faktörü- α gibi dış uyarılar ile tetiklenen ekstrinsik (dış) yollardır. Bu yolların birbirleri ile bağlantılı olduğu ve bir yoldaki moleküllerin diğer yolları etkilediği bilinmektedir (199). Ayrıca T-hücre aracılı sitotoksiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren bir yolağa daha bulunmaktadır (200,201). Bu yolağa granzim-A yolağı olarak adlandırılır ve kaspazın doğrudan aktivasyonu ile granzim-B yolağı ve DNA fragmentasyonu ile başlamaktadır. Fakat intrinsik ve ekstrinsik yollar ana apoptotik yollar olarak tanımlanmaktadır (201).

Apoptozisin başlayabilmesi için öncelikle ilgili genetik mekanizmanın harekete geçebilmesi için bir sinyale ihtiyaç vardır. Bu sinyal hücre içinden ya da dışından gelebilmektedir (202). Ayrıca apoptoz önceden hazırlanmış olan hücrede (primer) başlatılabilir ya da sekonder olarak da gelişebilmektedir. Aynı zamanda seramid, kalsiyum, Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi bazı proteinler ve mitokondriler apoptozun düzenlenmesinde yer almaktadır (203). Kaspazlar fonksiyonlarına göre, başlatıcı kaspazlar

(kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olarak ayrılmaktadır (204).

İntrinsik apoptoz, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal hasar, iyonlaştırıcı radyasyonun sebep olduğu genetik hasar, sitokin yoksunluğu ve DNA hasarı gibi çeşitli durumlarda aktive olmaktadır (205). Proapoptotik ve antiapoptotik fonksiyonlara sahip olan BCL-2 proteinleri intrinsik apoptozda düzenleyici olan ve apoptozun belirlenmesinde önemli bir protein ailesidir (206). BCL-2 protein ailesi apoptozisi indükleyen (BID, BAD, BAK, BAX) ve inhibe eden (BCL-2, E1B-19K, CED-9, BCL-X1) proteinlerden oluşmaktadır. Ayrıca BCL-2 protein ailesi üyeleri kendi aralarında homo ve heterodimerler oluşturmaktadır (207). Hücreden gelen uyarılar ile apoptotik uyarının alınır ve proapoptotik ailesinde BID, antiapoptotik protein BCL-2 inaktive edilir. Aynı zamanda BAX ve BAK aktifleşerek eksprese olarak Apaf-1'e bağlanarak Apaf-1'i serbestleştirir. Bu şekilde de MOMP artar ve hasar gören mitokondriden sitokrom-c salınımı olur. Sitokrom-c, kaspaz-9'u iskelet proteini olan Apaf-1 üzerinde harekete geçirir ve bunlara bağlanan ATP ile birlikte apoptozom adını alırlar. Bu başlatıcı kaspazlar, çok kritik hücreyel proteinleri parçalayarak, hücre yıkımına aracılık eden efektör kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) parçalayabilir veya aktive edebilir. Böylece kaspaz kaskadı başlatılır. Bu durum da mitokondriyal membran geçirgenliğini bozmaktadır (208–210).

Ekstrinsik apoptotik sinyal yolağı hücre zarında olan tümör nekroz faktör (TNF) ve Fas ailesinin ölüm reseptörlerinin, ölüm sinyalleri olan FasL ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile bağlanmasıyla başlar ve prokaspaz-8 etkileşimi ile ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) yapısı oluşur. İnaktif haldeki prokaspaz-8, aktif kaspaz-8'i aktive eder (211). Ardından kaspaz-8 efektör kaspaz-3'ü ya direkt aktive eder ya da BID'i parçalayarak sitokrom-c salınımı olur ve bu kaspaz-9 aktive ederek kaspaz-3 de aktive etmektedir. Böylece intrinsik yolağı aktive olmuş olur. Direkt kaspaz-3'ü aktive etmesiyle hücre ölümüne sebep olan protein ve hücre iskeleti yapısında bozulmalar başlar (Şekil-12) (212,213).



Şekil- 12: Apoptozis mekanizması (214).

Testiküler dokuda apoptozis sık olarak meydana gelen bir olaydır. Spermatogenez sırasında hücre gelişim ve farklılaşması gerçekleşir ve bazı durumlarda fonksiyonu, morfolojisi veya genetiği bozulmuş spermiler oluşur ve bunların ortadan kaldırılması için erkek germ hücrelerinde apoptoz gerçekleşir (215). Ayrıca testiküler doku sıcaklık, radyasyon ya da diyabet gibi etkilere bağlı olarak da apoptozis artış gösterebilmektedir (216). Diyabetten kaynaklı olarak artan oksidatif stres sonucunda apoptozun arttığı bilinmektedir. Bundan kaynaklı olarak testiküler dokuda hasar, spermatogenez işleyişinde

bozulma, sperm hücre kaybı ve DNA hasarı gibi durumlara sebep olup infertiliteye sebep olabileceği belirtilmiştir (217,218).

3.8 PCNA (Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni)

Proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA)'nın keşfi 1978 yılında Miyachi ve arkadaşları tarafından lupus eritematozuslu hastalarda proliferen olan hücrelerde gerçekleşmiştir (219). Tüm hücreler genomun sadık bir şekilde aktarımını sağlamak ister bu yüzden hatasız bir replikasyon ve oluşan DNA hasarının onarımını gerçekleştirir. PCNA, DNA replikasyonu, DNA hasar onarımı, kromatin montajı, kohezyon oluşumu ve hücre siklusunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olan nükleer nonhiston proteindir (220).

DNA replikasyonunda PCNA'nın rolünün kesin kanıtı, yapılan in vitro maymun virüsü 40'ın replikasyonu için PCNA'nın gerekli olduğunun keşfiyle gerçekleşmiştir (221). Ardından PCNA'nın DNA polimeraz delta (pol δ) için, onu daha işleyici hale getirerek aktivitesini artıran yardımcı bir protein olduğu anlaşılmıştır (222). Daha sonra PCNA'nın DNA polimeraz epsilon (pol ϵ) (223,224) için yardımcı bir faktör olduğu gösterilmiştir. 1990'ların başlarında, PCNA'nın rolü, ökaryotik replikatif polimerazların işlem faktörü olarak görülmeye başlanmıştır. PCNA'nın X-ışını kristal yapısı belirlendiğinde, PCNA'nın DNA polimerazlarına nasıl yüksek işlenebilirlik kazandırdığının anlaşılması sağlanmıştır (224). Ayrıca PCNA'nın hücre siklusunda geç G1 fazında başlayarak orta geç S fazına kadar yoğun olarak sentezlendiği bilinmektedir (225,226). DNA hasarı durumunda PCNA ekspresyonu artarak hasarın onarılmasını sağlamaya çalışmaktadır. Eğer hasar tamiri gerçekleşmiyor PCNA düzeyi azalmaya başlar ve hücre apoptoza gitmektedir (227,228). Aynı zamanda tümör hücrelerinde de PCNA ekspresyonu normalin üzerinde bir artış gösterdiği bilinmektedir (229,230).

4 GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Deney Hayvanlarının Temini

Deney çalışmamız, Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 28.03.2019 tarih ve 2019/04'nolu izin çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (DÜSAM) 10-12 haftalık ağırlıkları 240-350 gr aralığında değişen 30 adet Wistar Albino cinsi erkek rat temin edilmiştir. Hayvanların standart koşullar altında (oda sıcaklığı 24-26 °C, %55-60 nem oranı, 12 saat gece 12 saat gündüz ışık döngüsü olan odada) uygun kafesler içinde barınmaları sağlanmıştır. Deney hayvanların beslenmeleri için standart pelet yem ve suya ad libitum erişimleri sağlanmıştır.

4.2 Deneyin Tasarlanması

DÜSAM'dan temin edilen 30 rat; her bir grupta 6 rat olmak üzere grupların vücut ağırlık ortalamaları birbirlerine yakın olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Kontrol, Diyabet, Diyabet+ Çörek Otu Yağı, Diyabet + Metformin, Diyabet + Vitamin E grubu şeklinde düzenlenmiştir. Her bir grup ayrı kafeslerde olacak şekilde barındırıldı. Deney başlangıcında tüm ratların vücut ağırlıkları ve kan glukoz değerleri ölçülüp kaydedilmiştir. Ardından Streptozosin (STZ) ile diyabet grupları oluşturulup 1 hafta sonra deneye başlandı. Deney düzeneğinde;

Kontrol grubu: Grupta yer alan ratlara hiçbir işlem uygulanmamıştır. Deney süresi boyunca her bir ratın haftalık vücut ağırlığı ve kan glukoz değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

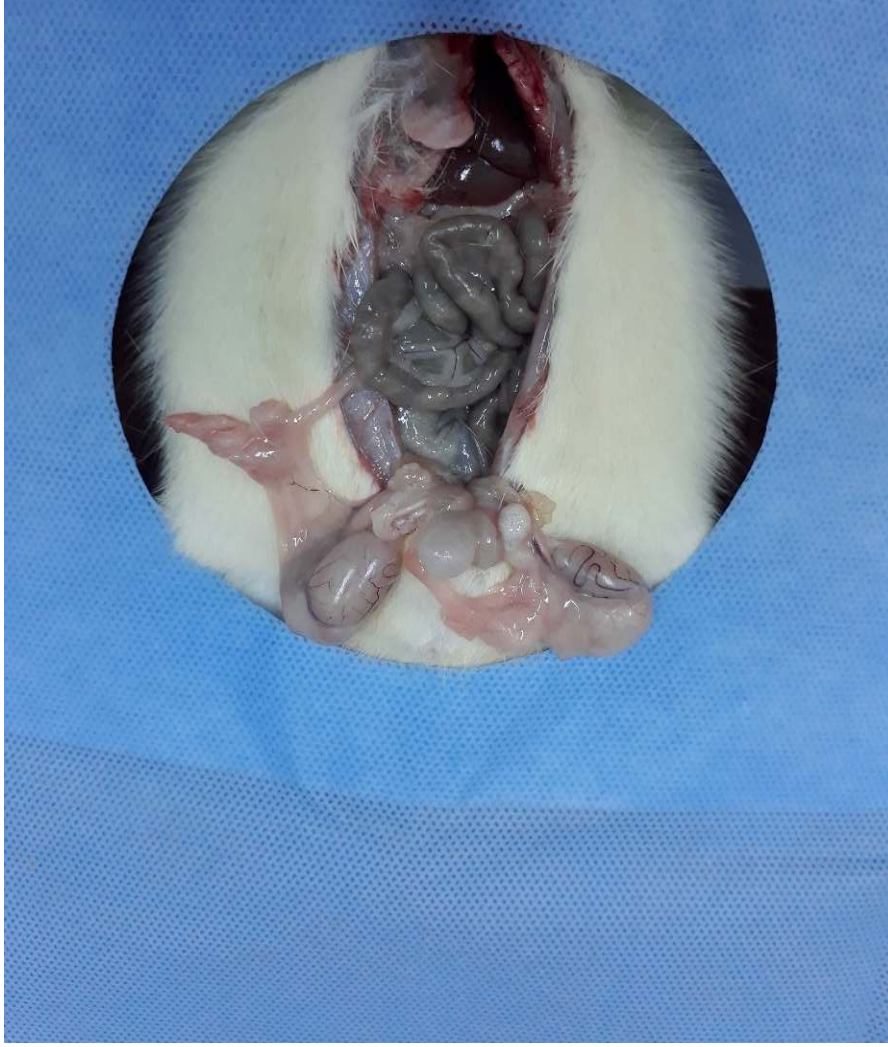
Diyabet grubu: Bu grupta başlangıçta diyabet oluşturulmuştur. Deney süresi boyunca her bir ratın haftalık vücut ağırlığı ve kan glukoz değerlerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Diyabet+ Çörek Otu Yağı grubu: Grupta deney başlangıcında diyabet oluşturulmuş olup günlük 2.5 ml / kg dozda Çörek Otu Yağı gavaj yardımı ile oral yolla verilmiştir. Deney süresi boyunca her bir ratın haftalık vücut ağırlığı ve kan glukoz değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

Diyabet + Metformin grubu: Grupta deney başlangıcında diyabet oluşturulmuş olup günlük 100 mg / kg dozda Metformin salin solüsyonu içerisinde çözündürülerek gavaj yardımı ile oral yolla verilmiştir. Deney süresi boyunca her bir ratın haftalık vücut ağırlığı ve kan glukoz değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

Diyabet + Vitamin E grubu: Grupta deney başlangıcında diyabet oluşturulmuş olup günlük 100 mg / kg dozda vitamin E zeytinyağı içinde çözündürülerek gavaj yardımıyla oral yolla verilmiştir. Deney süresi boyunca her bir ratın haftalık vücut ağırlığı ve kan glukoz değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

8 hafta boyunca tüm ratlardan elde edilen vücut ağırlıkları ve glukoz kan değerleri ölçüm sonuçları istatistiksel analiz için kaydedilmiştir. Deney 56 günün bitiminde sonlandırılmıştır. Sonlandırılama işleminin hemen öncesinde tüm deney gruplarının son ölçümler yapılmıştır. Daha sonra ratlar 75 mg/kg ketamin + 10 mg/kg ksilazin doz uygulaması ile anestezi altına alınmış olup kalpten kan almak suretiyle sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen ratlardan sol testis, epididimis, prostat ve seminal veziküller alındı ve hassas terazi yardımıyla ağırlıkları ölçülüp kaydedildi. Epididimisler sperm analizine alındı. Testisler de Bouin solüsyonunda fikse edildi. Oluşan atıklar, imha edilmek üzere toplama poşetlerine alınarak görevli personele teslim edilmiştir.



Resim- 5: Laparotomi ve testis rezeksiyonu.

4.3 Diyabetin Oluşturulması

Diyabet oluşturulacak gruptaki ratlar uygulama öncesi 12 saat aç bırakıldı. Uygulamadan hemen önce tekrar kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Ardından ratlar için tek doz 45 mg/kg Streptozosin (STZ) (Sigma, USA), sodyum sitrat solüsyonu (pH: 4.5, 0.1 M) içerisinde çözölürölerek intraperitoneal olarak ratlara verildi (231). STZ uygulamasından 72 saat sonra 12 saatlik açlığın ardından hayvanların kuyruk veninden kan alınarak kan glukometre aracılığı ile (VivaChek Eco) kan glukoz düzeyleri ölçölüp kaydedildi ve kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olan ratlar diyabetik kabul edilip deneye alınmıştır (232).

4.4 İlaç Dozlarının Uygulanması

Çörek otu yağı, yerel bir aktardan temin edilmiş olup diyabet oluşturulduktan 1 hafta sonra 2.5 ml / kg dozunda orogastrik yolla 56 gün süreyle verilmiştir (233). Metformin (Cat# sc202000B Santa Cruz Biotechnology, Inc), diyabet oluşturulduktan 1 hafta sonra 100 mg / kg dozunda salin solüsyonu içerisinde çözündürülerek orogastrik yolla 56 gün süreyle verilmiştir (234). Vitamin E (Cat#T325-25G, Sigma, St. Louis, Missouri, ABD), diyabetin oluşturulmasından 1 hafta sonra 100 mg / kg vücut ağırlığı dozunda zeytinyağı içerisinde çözündürülerek orogastrik yolla 56 gün süreyle her gün verildi (235).

4.5 Histolojik Doku Takibi

Deney sonunda sakrifiye edilen ratlardan alınan sol testis dokuları Bouin solüsyonunda 6 saat ön fiksasyona alındı. Daha sonra dokular küçültülerek 18 saat boyunca Bouin solüsyonunda fiksasyona devam edildi. doku örnekleri %70lik alkolde yeterli düzeyde yıkandı. Alınan doku örnekleri 12'şer saat arayla %80, %90, %96 ve absolu alkolden geçirildi. Ardından dokular xylol içine alınarak 2 kez 30'ar dakika şeffaflaştırıldı ve daha sonra 58°C'deki etüvde %50 xylol içeren parafin içinde 1,5 saat inkübasyonuna alındı. Ardından temiz eritilmiş parafin içerisinde 58°C'deki etüvde 2 saat süreyle parafin banyosunda tutuldu. Daha sonra doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica) ile 5 µm kalınlığında alınan kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı.

4.6 Histokimyasal metodlar

Pozitif şarjlı lamlara alınan doku örneklerine boyama öncesi 1 saat 58°C'deki etüvde parafin depolimerizasyonu sağlanmıştır. Etüvden alınan kesitlere, histolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H&E), bazal membran değişiklikleri için Periyodik asit-Schiff (PAS) ve kollajen için Van Gieson boyama protokolleri uygulandı.

4.6.1 Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

1. Alınan kesitler Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.
2. Kesitler azalan alkol serilerinin her birinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5 dakika geçirilerek distile suya getirildi.

3. Çekirdek boyaması için Harris Hematoksilen solüsyonunda kesitler 7 dakika boyunca bırakıldı.
4. Akarsuda 5 dakika kadar yıkandıktan sonra %90'lık etil alkole kesitler daldırıldı.
5. Zıt boyama olarak kesitler %1 alkolik eozin de 2 dakika boyunca boyandı.
6. Ardından kesitler artan alkol serilerinden geçirildi.
7. Daha sonra Xylolde 2x15 dakika bekletilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi.
8. Kesitler entellan ile kapatıldı.

4.6.2 Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler 2x10 dakika xylolde bekletilerek deparafinize edildi.
2. Azalan alkol serilerinden; %100 Alkolde 10 dakika, %96'lık alkolde 5 dakika, %90'lık alkolde 5 dakika, %70'lik alkolde 2 dakika ve %50'lik alkolde 2 dakika bekletilerek distile suya kadar getirilip 5 dakika bekletildi.
3. Kesitler PAS (Bio Optica, lot/cat#4117) kit prosedürü takip edilerek boyandı.
4. Kesitlerin üzerine A solüsyonundan 10 damla dökülerek 30 dakika bekletildi.
5. Kesitlerin üzerindeki solüsyon döküldü ve yıkanmadan üzerine 15 damla B solüsyonundan damlatılarak 10 dakika beklendi.
6. Kesitler şale içerisinde çeşme suyunda 5 dakika yıkandıktan sonra, distile suda 2 dakika yıkandı.
7. Kesitlerin üzerine 10 damla C solüsyonu damlatılıp 10 dakika bekletildikten sonra distile suda yıkandı.
8. Kesitler üzerine 10 damla D solüsyonu damlatılıp 20 dakika bekletildi sonra distile suda yıkamaya alındı.
9. Kesitler üzerine 10 damla E solüsyonu damlatılıp 2 dakika bekletildi.
10. Kesitleri yıkamadan üzerindeki solüsyon dökülerek, üzerlerine F solüsyonundan 10 damla damlatıldı ve 3 dakika beklendikten sonra distile suda yıkandı.
11. Kesitlerin üzerine 10 damla G solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildikten sonra çeşme suyunda mavi boya gidinceye kadar yaklaşık 5 dakika yıkandı.
12. Kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. %100'lük alkolde de 1 dakika bekletildi.
13. Dehidre edilen kesitler 2x15 dakika xylol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırıldı.
14. Daha sonra entellan ile kapatıldı.

4.6.3 Van Gieson Boyama Protokolü

1. Alınan kesitler Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edilip şeffaflaştırıldı.
2. Kesitler azalan alkol serilerinin her birinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5 dakika bekletildikten sonra distile suya getirildi.
3. Weigert çalışma solüsyonunda 10 dakika bekletildi.

4. Distile suda çalkalandı.
5. Van Gieson boya solüsyonunda 3 Dakika bekletildi.
6. %95' lik etil alkolde 2x2 dakika bekletildi.
7. %100' lük etil alkolde 2x2 dakika bekletildi.
8. Dehidre edilen kesitler 2x15 dakika xylol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırıldı.
9. Entellan ile kapatıldı.

4.7 İmmunohistokimyasal Metodlar ve TUNEL Assay

Rutin histolojik doku takibi sonrasında testislerden alınan kesitlerde antikor boyaması olarak Proliferasyon Hücre Nükleer Antijen (PCNA) ve Caspase-3 uygulaması yapıldı. Aynı zamanda doku kesitlerinde Apoptotik Index değerlendirmesi amacıyla TUNEL Assay uygulanarak testiküler DNA fragmentasyonu incelendi.

4.7.1 PCNA immunohistokimyası

1. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.
2. Daha sonra xylolden temizleme işlemi ve rehidrasyon için azalan alkol serilerinin (%100, %100, %96, %90, %80, %70) her birinde 5 dakika bekletilip distile suya getirildi.
3. Kesitler, antijen retrieval işlemi için etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonuna alındı ve mikrodalga fırında 3x6 dakika ısıtıldı.
4. Kesitler mikrodalga fırından alınarak 15 dakika oda sıcaklığında soğuma işleme alındı.
5. Kesitler 3x5 dk tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Yıkama işlemi sırasında kesitlerin kurumaması için immunohistokimya barı hazırlanıp nemli bir ortam sağlandı. Ardından hidrofobik kalem ile kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi.
7. Kesitlerin üzerine metanol içerisinde hazırlanan %3'lük H₂O₂'de damlatılarak 20 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi.
8. Kesitler PBS'e alınarak 3x5 dakika süreyle yıkandı.
9. Kesitlere Ultra V Block solusyonunda (Thermo, cat no: TA-125-UB) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı.
10. Örnekler yıkamaya alınmadan antibody diluent (Thermo, cat no: TA-125-UD) ile 1/250 oranında dilüe edilen PCNA primer antikor (Santa Cruz, cat no: Sc-25280) ile +4 °C'de gece boyunca inkubasyona bırakıldı.

11. Ertesi gün kesitler oda ısısında (28 °C) 1 saat ek inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
12. Kesitler anti-rabbit sekonder antikör ile (Thermo, cat no: TP-125-BN) 30 dakika süreyle inkübe edildi.
13. Sekonder antikörden alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika süreyle yıkandı.
14. Kesitler 30 dakika süreyle oda ısısında streptavidin peroksidaz (Thermo, cat no: TS-125-HR) ile enzim bağlanması için inkübe edildi.
15. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
16. Kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB) kromojen (Thermo, cat no: TA-125-HD) ile reaksiyona tabi tutuldu.
17. Mikroskop altında reaksiyon izlendi ve spesifik tutunum gözlemlendiğinde kesitler PBS'e alınarak reaksiyon sonlandırıldı.
18. Kesitler 40 saniye süreyle Mayer hematoksilen ile zıt boyamaya yapıldı.
19. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkama işlemi gerçekleştirildi.
20. Kesitler artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi.
21. Kesitler Xylol'de 2x15 dakika bekletilerek şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.
22. Ardından kesitler entellan ile kapatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler daha sonra analiz edilmek üzere kapalı lam kutularında muhafaza edildi.

4.7.2 Caspase-3 immunohistokimyası

1. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.
2. Kesitler xylolden temizleme işlemi ve rehidrasyon için azalan alkol serilerinin (%100, %100, %96, %90, %80, %70) her birinde 5 dakika bekletilip distile suya getirildi.
3. Kesitler, antijen retrieval işlemi için sitrik asit tamponu (ph:6.0, 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak 10 dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu.
4. Kesitler mikrodalga fırından alınarak 20 dakika oda sıcaklığında soğuma işleme alındı.
5. Kesitler 3x5 dk tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Yıkama işlemi sırasında kesitlerin kurumaması için immunohistokimya barı hazırlanıp nemli bir ortam sağlandı. Ardından hidrofobik kalem ile kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi.
7. Kesitlerin üzerine metanol içerisinde hazırlanan %3'lük H₂O₂'de damlatılarak 25 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi.
8. Kesitler PBS'e alınarak 3x5 dakika süreyle yıkandı.

9. Kesitlere Ultra V Block solusyonunda (Thermo, cat no: TA-125-UB) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı.
10. Örnekler yıkamaya alınmadan antibody diluent (Thermo, cat no: TA-125-UD) ile 1/100 oranında dilüe edilen cleaved caspase-3 primer antikoru (Cell signaling, cat no: 9661L) ile +4 °C’de gece boyu inkübe edildi.
11. Ertesi gün kesitler oda ısısında (28 °C) 1 saat ek inkübasyona tabi tutuldu.
12. Daha sonra kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
13. Kesitler biyotinli rabbit sekonder antikoru (Vector Lab, cat no: BA 1000, 1:400 dilüsyon) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
14. Sekonder antikordan alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika süreyle yıkandı.
15. Kesitler 40 dakika süreyle oda ısısında Streptavidin peroksidaz (SCYTEK, cat no: ABG125) ile enzim bağlanması için inkübe edildi.
16. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
17. Kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB) kromojen (SİGMA, cat no: D4168) ile reaksiyona tabi tutuldu.
18. Mikroskop altında reaksiyon izlendi ve spesifik tutunum gözleendiğinde kesitler PBS’e alınarak reaksiyon sonlandırıldı.
19. Kesitler 40 saniye süreyle Mayer hematoksilin ile zıt boyamaya yapıldı.
20. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkanan kesitler artan alkol serilerinde 5’er dakika bekletildi.
21. Kesitler xylol’de 2x10 dakika bekletilerek şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.
22. Kesitler entellan ile kapatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler daha sonra analiz edilmek üzere kapalı lam kutularında muhafaza edildi.

4.7.3 TUNEL Assay

1. Alınan kesitler 3 seri 5’er dakika xylol’de deparafinize edildi.
2. Kesitler azalan alkol serilerinde (%100,100,96,90,80,70) 5’er dakika bekletildi.
3. Distile suda 5 dakika yıkandı.
4. Yıkanan kesitler PBS’te 5 dakika bekletildi.
5. PBS’den alınan kesitler için TUNEL Assay için ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit kullanıldı (Merck Millipore, S7100).
6. Oda ısısında 15 dk süreyle 20 µg/ml Proteinaz K solüsyonunda permeabilize edildi
7. Kesitler 2 seri dH₂O’da 2’şer dakika bekletildi.
8. PBS’te hazırlanan %3’lük H₂O₂’de 5 dakika endojen peroksidaz inhibisyonu yapıldı.
9. Kesitler PBS içerisinde 5 dakika süreyle yıkandı.
10. PBS’den alınan kesitler Equilibrasyon buffer ile 1 dakika inkübasyona bırakıldı.

11. Daha sonra yıkama işlemi yapılmadan kesitler üzerine Working solüsyonu damlatıldı ve 1 saat süreyle 37 °C'lik etüvde inkübe edildi.
12. İnkübatörden alınan kesitler 10 dakika süreyle yıkama solüsyonunda bekletildi.
13. Kesitler 3 seri 1'er dakika süreyle PBS'te yıkandı.
14. Yıkanan kesitlere anti-digoxigenin konjugat damlatıldı ve oda ısısında 30 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi.
15. Kesitler 4 seri PBS'te 2'ser dakika süreyle yıkandı.
16. Peroksidaz substratı hazırlandı ve kesitlerde kromojenik reaksiyon oluşana kadar mikroskop altında gözlendi.
17. Reaksiyon gerçekleştiğinde durdurmak amacıyla kesitler distile suda yıkandı.
18. Yıkanan kesitler zıt boyama için hematoksin ile 30 saniye süreyle boyama gerçekleştirildi.
19. Ardından kesitler artan alkol serilerinde (%70,80,90,96,100) 3'er dakika süreyle dehidre edilen örnekler 2 seri 10'ar dakika süreyle xylol'de şeffaflandırıldı ve entellan ile kapatıldı. Hazırlanan kesitlerin mikroskopta incelenmesi ve değerlendirmeleri yapılarak mikrografları çekildi.

4.8 Epididimal Spermatolojik Analizler

Epididimal spermin elde edilmesi ilgili analizler daha önce Taş ve ark., Alp ve ark. yaptığı şekilde gerçekleştirildi (236,237). Sakrifiye edilen hayvanlarda sol testislere bağlı epididimisler diseke edilerek ayrıştırıldı. Elde edilen epididimisler, içerisinde izotonik bulunan steril numune taşıma kaplarında 37 °C'de analiz yapılmak üzere Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Sperma ve Embriyo üretim ünitesine gönderildi. Laboratuvara gelen epididimis örnekleri 10 ml izotonik içerisine alındı ve bistüri kullanılarak kıyma haline getirildi (Resim-6) ve 2 dakika süreyle 37 °C'ye ayarlı sıcak su banyosu içerisinde shakerda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10 ml'lik izotonik toplanarak konsantrasyon, motilite, vitalite (%) ve morfolojik değerlendirme için 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı.



Resim- 6: Epididimisin kıyma haline getirilme işlemi.

4.8.1 Epididimal sperm konsantrasyonunun değerlendirilmesi

Süspanse haldeki spermden 1 ml alınarak 1:10 oranında sperm süspansiyonu Hancock's tamponlanmış formol salin solüsyonu ile karıştırıldı. Elde edilen örnekler konsantrasyon yönünden değerlendirilmek üzere Thoma lamalarına alındı ve ışık mikroskopunda incelendi. Hancock's tamponlanmış formol salin solüsyonu 100 ml distile su içerisinde 5 g sodyum bikarbonat, 1 ml 37% formaldehit ve 25 mg eozin çözülerek hazırlandı. Sayım için hazırlanan örnekler ışık mikroskopunda Thoma lamında değerlendirildi ve ml'deki toplam sperm sayısı elde edildi. Thoma lamında 16 büyük, her büyük karenin içerisinde ise 16 küçük kare bulunmaktadır. Sayım için 5 büyük kare (toplamda 80 küçük kare) göz önünde

bulunduruldu ve çalışmamızda sperm konsantrasyon hesaplaması için aşağıdaki formül uygulandı;

$$\text{Konsantrasyon} = \frac{\text{Thoma lamında sayılan sperm sayısı}}{\text{Sayılan toplam küçük kare sayısı} \times \text{Bir küçük karenin hacmi} \times \text{Sulandırma oranı}}$$

Konsantrasyon sayımı her hayvanda 3 tekrar halinde gerçekleştirildi ve elde edilen ortalama değer konsantrasyon ($\times 10^6/\text{mL}$) olarak tespit edildi.

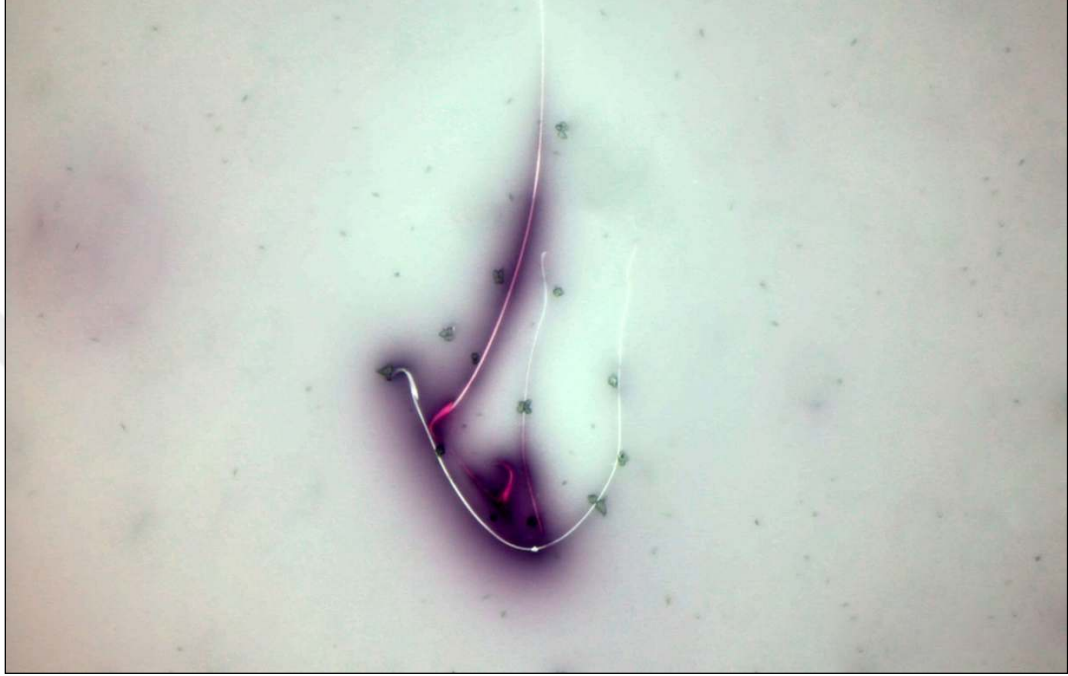
4.8.2 Epididimal spermin motilite yönünden incelenmesi

Süspanse haldeki sperm örneklerinden bir başka tüpe 1 ml aktarıldı ve üzerine 2 ml 4% gliserol içeren Tris egg yolk extender solüsyonu eklendi. Extender solüsyon hazırlanırken 100 ml distile su içerisinde 1.00 g Fruktoz, 1.30 g sitrik asit, 2.40 g Tris (hydroxymethyl-aminomethane), 8 ml Gliserol, 20 ml yumurta sarısı, 1000 IU/ml Penisilin G, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin sülfat çözülerek hazırlandı (238). Hazırlanan sulandırılmış spremden 40 μl alınarak lam üzerinde faz kontrast mikroskopunda (Olympus BX 51) incelendi. Spermatozoa progresif ve ileri yöne ilerliyorsa motil diğer durumlarda immotil kabul edildi. Her örnekte rastgele seçilen 100 spermatazoa motil/immotil olarak değerlendirildi ve yüzde motilite değeri hesaplandı. Her hayvanda hazırlanan üç örnekte aynı işlem yapıldı ve ortalama motilite oranı (%) hesaplandı.

4.8.3 Epididimal spermde vitalite oranı ve morfolojik değerlendirilme

Vitalite değerlendirmesi ve morfolojik değerlendirme için süspanse haldeki sperm, 1.67% eosin, 10% nigrosin ve 0.1 M sodyum sitrat içeren boya solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 40 μl lamaların üzerine damlatılarak froti çekildi. Oda ısısında kurumaya bırakılan örnekler ışık mikroskopunda vitalite ve morfolojik değerlendirme için kullanıldı. Vitalite değerlendirmesi yapılırken hücre membranı hasar görüp boya içine nüfuz eden hücreler ölü, beyaz ve parlak görünen hücreler canlı olarak kabul edildi (Resim-7). Her hayvanda rastgele seçilen 100 adet spermatozoa vitalite yönünden dergelendirilip yüzdesel değerler hesaplandı. Aynı preparatlarda yine rastgele seçilen 100 adet spermatozoa baş, boyun, kuyruk ve total/miks anormallik yönünden

incelendi. İncelenen anomaliler yüzdesel verilere dönüştürüldü. Elde edilen tüm spermatolojik veriler istatistiksel yönden değerlendirildi.



Resim- 7: Boya nüfuz eden (ölü) ve boyayı hücre dışında tutan (canlı) spermatozoonlar.

4.9 Morfometrik ve İstatistiksel Analiz

Testis dokularından elde edilen kesitlerde yapılan ölçüm ve analizler istatistiksel yönden incelendi. Hayvanların deney öncesi ve sakrifikasyon öncesindeki vücut ağırlıkları ile kan glukoz düzeyleri ve deney sonunda sakrifiye edilen ratların sol testis, epididimis, prostat ve seminal vezikül ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldı.

Rutin boyanan preparatlardan elde edilen Johnsen biyopsi skorlaması, seminifer tubül çapı, tunika albuginea kalınlığı, germinal epitel kalınlığı, bazal membran kalınlığı verileri göz önünde bulunduruldu.

Seminifer tubül çapı, değerlendirmesi için gruptaki her bir rat için rastgele 10 tubül olmak üzere her grupta toplam 60 tubül çap ölçümü yapıp 5 deney grubunda toplamda

300 tubül çapı ölçülerek değerlendirme yapıldı. Tunika albuginea kalınlığı, germinal epitel kalınlığı ve bazal membran kalınlığı değerlendirmesi için ise her bir parametre için gruplardaki her bir rat için rastgele 10 farklı bölge olmak üzere her grupta toplam 60 ölçüm olup 5 deney grubunda toplamda 300 ölçüm yapılarak değerlendirildi (239).

Johnsen biyopsi skorlaması için her bir gruptan rastgele 200 seminifer tubül skorlamaya tabi tutulmuş olup 5 deney grubunda toplam 1000 seminifer tubül değerlendirilerek veriler elde edildi. Johnsen skorlaması Tablo 1’de yer alan kriterlere göre yapılmıştır.

Ayrıca, sakrifikasyon sonrası epididimal spermden elde edilen motilite yüzdesi, ml’deki spermatozoa konsantrasyonu, vitalite, baş, boyun, kuyruk ve toplam spermatozoa defekt oranları istatistiksel analize tabi tutuldu.

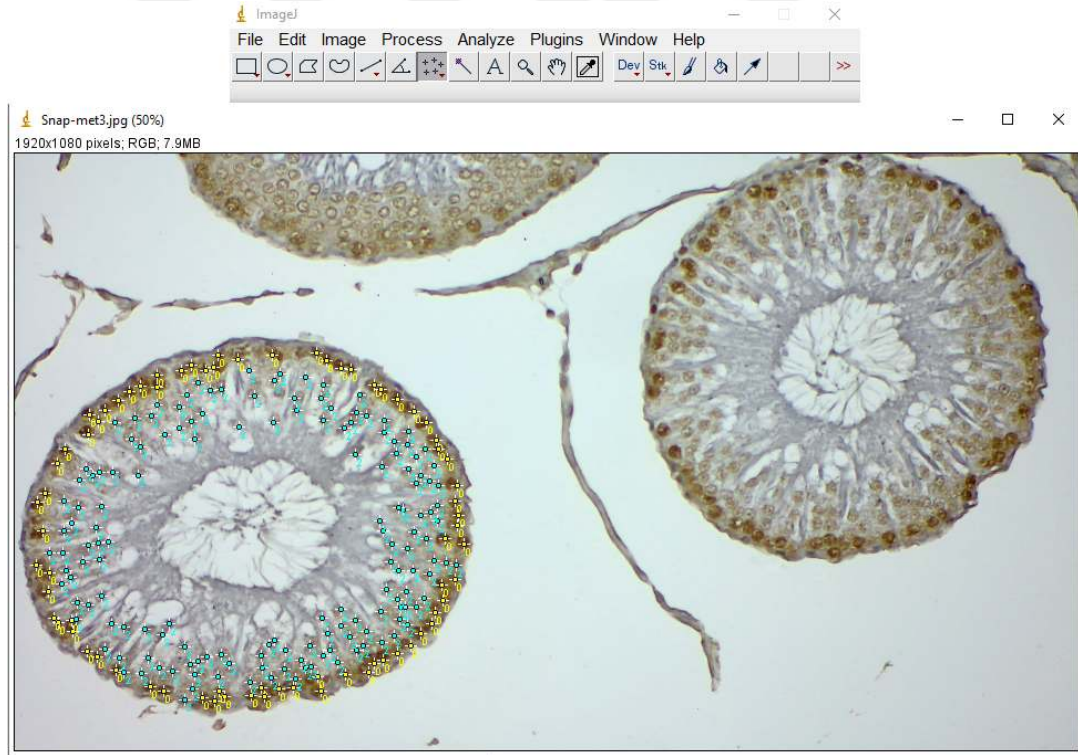
Tablo- 1: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması (240).

Johnsen Biyopsi Skorum Tablosu	
Değerlendirme	Skor
Düzenli ve tam spermatogenezis ve tubül yapısı mevcut.	10
Lumende yoğun spermatozoa ancak spermatogenik hatta düzensizlik ve epitel organizasyonunda bozulma mevcut.	9
Lumende az miktarda spermatozoa ve geç spermatid mevcut.	8
Lumende spermatozoa yok ancak spermatidler mevcut.	7
Çok az sayıda spermatid mevcut.	6
Spermatozoa ve spermatid yok ancak yoğun spermatosit mevcut.	5
Çok az sayıda spermatosit mevcut.	4
Yalnızca spermatogonia mevcut.	3
Germ hücresi bulunmuyor sadece Sertoli hücreleri mevcut.	2
Germ hücresi veya Sertoli hücresi bulunmuyor.	1

Rutin boyanan kesitlerden elde edilen verilerin analizinde normallik testi sonuçlarına göre Johnsen biyopsi skorlaması, tunika albuginea kalınlığı, germinal epitel kalınlığı ve bazal membran kalınlığı ölçümlerinin non parametrik Kruskal Wallis testi ile, seminifer tubül çaplarının ise parametrik One Way Anova ile analiz edilmesine karar kılındı. Non parametrik Kruskal Wallis Testinde Post hoc Tamhane’s T2, parametrik One Way ANOVA testinde ise post hoc olarak Tukey testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalar

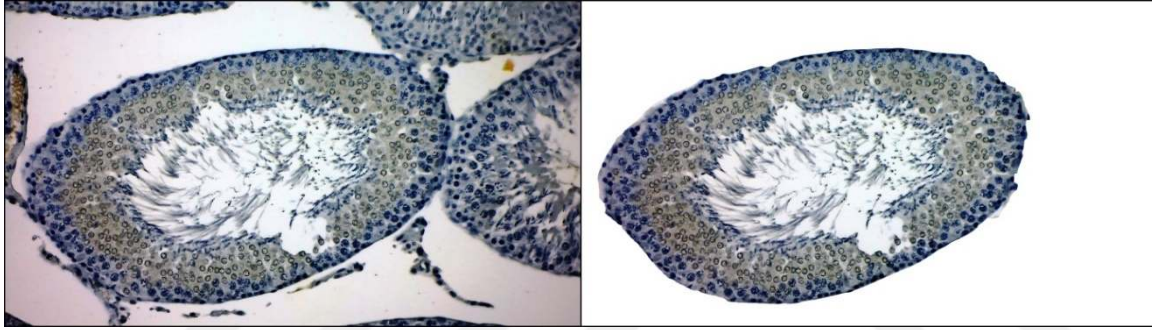
gerçekleştirildi. Tüm elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterildi ve $p < 0,05$ istatistiksel yönden anlamlı kabul edildi.

Her rat preparatında rastgele 10 adet olmak üzere her grupta 60 seminifer tubül seçildi. Hem PCNA immunohistokimya hem de TUNEL Assay yöntemiyle nukleuslar işaretlenmekte ve hücrelerin proliferasyon özelliği ile apoptotik hücre işaretlemeleri yapılabilmektedir. Bu sebeple her iki protokol sonunda PCNA pozitif germinal epitel hücre oranı ve TUNEL Assay pozitif hücre oranı hesaplaması için germinal epitelde yer alan hücreler pozitif veya negatif olarak işaretlendi. Her tubül içerisinde hücrelerin işaretlemeleri sonrasında pozitif hücrelerin tubül içerisindeki toplam hücre sayısına oranlamaları ile PCNA pozitiflik ve TUNEL Assay pozitiflik oranları yüzdesel olarak elde edildi (şekil-13).



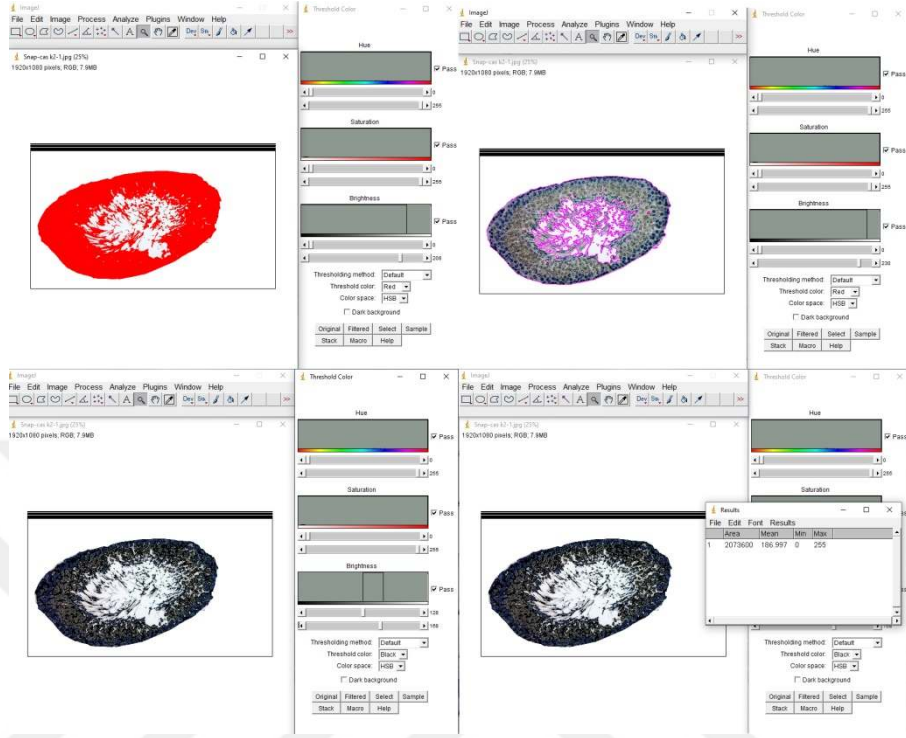
Şekil- 13 : Image J’de PCNA ve TUNEL Assay pozitifliklerin sayımı. Pozitif hücreler (sarı) ve negatif hücreler (turkuaz) ile işaretlenerek sayılmış pozitif hücre oranları elde edilmiştir.

Caspase-3 analizi için her rat preparatında rastgele 10 adet olmak üzere her grupta 60 seminifer tubül seçildi. 5 deney grubunda toplamda 300 adet seminifer tubül değerlendirilmiştir. Ardından analiz için DAB kahverengi boyama alanları ve Hematoksilen mavi boyama alanların oran hesaplaması yapıldı. Yapılan işaretlemeler sonunda toplam pozitif ve negatif değerler alındı. Caspase-3 immunohistokimya boyanan kesitlerde immonekspresyon düzeylerinin kantite hale getirilmesi için Image J programı kullanıldı. Kantitatif değerlerin elde edilmesinde öncelikle analize tabi tutulacak seminifer tubül etrafındaki artefakt ve diğer tubüllerden izole edildi (Şekil-14).



Şekil- 14: Caspase-3 analizine alınacak seminifer tubülün analiz için düzenlenmesi.

Etrafı temizlenen tubüller Image J programında boyanma yoğunluğuna göre analize tabi tutuldu. Bu işlem gerçekleştirilirken öncelikle yazılımda seminifer tubülün tamamı işaretlendi. Daha sonra işaretlenen alan piksel bazında hesaplandı. Total alan hesaplaması yapılan seminifer tubül daha sonra kromojen pozitif alan hesaplamasına tabi tutuldu (Şekil-15). Elde edilen total alan içerisinde pozitif alanlar oranlandı ve immunopozitiflik yüzdeleri elde edildi. Elde edilen veriler istatistiksel yönden analiz edildi.



Şekil- 15: Caspase-3 immunohistokimya için kantitatif verilerin elde edilmesi.

Seminifer tubüllerdeki pozitif hücre sayısı seminifer tubülde yer alan toplam hücre sayısını oranlanmasıyla elde edilen hücre pozitif sinyal yüzdesi SPSS 24.0 (IBM) programında istatistiksel analizi yapıldı.

5 BULGULAR

5.1 Morfometrik Bulgular

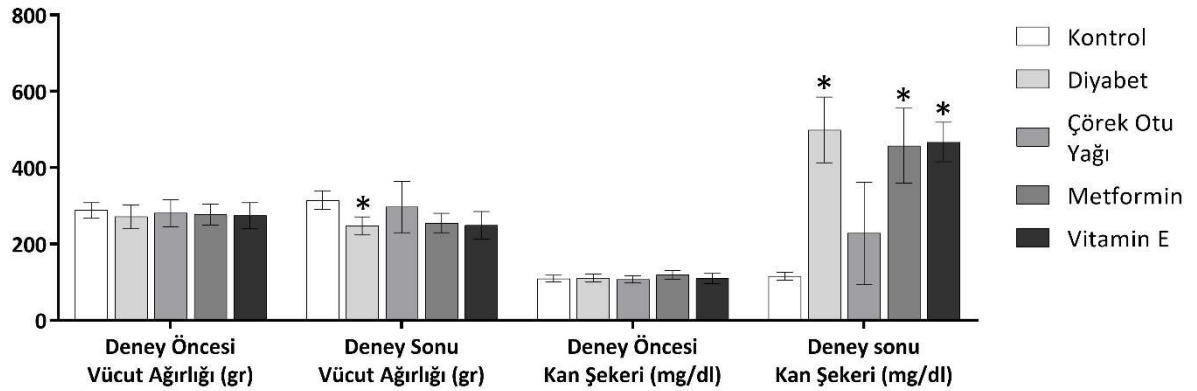
5.1.1 Deney öncesi ve sonu vücut ağırlık ve kan şekeri düzeyleri sonuçları

Deney öncesi vücut ağırlık ölçüm örnekleri istatistiksel olarak incelendiğinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edildi. Deney sonrası vücut ağırlıklarının istatistiksel sonuçlarında en yüksek ağırlık artışının kontrol grubunda olduğu ardından çörek otu grubunda da ağırlık artışının mevcut olduğu ve aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edildi. Metformin ve vitamin E gruplarında ağırlıklarında düşüş meydana geldiği fakat değer olarak kontrol ve diyabet grubu arasında yer almaktadırlar. Aynı zamanda istatistiksel olarak bu iki grup ile kontrol, çörek otu yağı ve diyabet grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucu elde edildi. Diyabet grubu ise en düşük ağırlık oranına sahip olup kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Deney gruplarının, deney öncesi kan şekeri düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi. Deney sonrası kan şekeri düzeyleri arasındaki istatistiksel sonuçta ise kontrol grubunun en düşük kan şekeri düzeyine sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca kontrol grubunun çörek otu yağı grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), metformin, vitamin E ve diyabet grupları ile arasında anlamlı derecede bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Çörek otu yağı grubunun kan şekeri düzeyinin diyabet, metformin ve vitamin E grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi (Tablo-2, Şekil-16).

Tablo- 2: Grupların deney öncesi ve deney sonu vücut ağırlık ve kan şeker düzeylerinin istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	<i>p</i> <i>değeri</i>
D.Ö. Vücut Ağırlığı	288,33±20,03 ^a	271,67±30,77 ^a	280,83±35,56 ^a	276,67±27,33 ^a	274,17±34,41 ^a	>0.05
D.S. Vücut Ağırlığı	314,33±23,73 ^a	247,33±23,39 ^b	296,67 ± 67,28 ^{ab}	255,00±25,14 ^{ab}	249,17±36,02 ^{ab}	<0.05
D.Ö. Kan Şekeri	109,33±8,96 ^a	111,17±10,46 ^a	107,17±9,56 ^a	118,83±11,51 ^a	109,50±13,44 ^a	>0.05
D.S. Kan Şekeri	115,67±10,93 ^a	499,00±85,92 ^b	228,00±133,65 ^a	457,50±97,89 ^b	467,33±51,38 ^b	<0.05



Şekil- 16: Grupların deney öncesi ve sonu vücut ağırlık ve kan şeker düzeylerinin istatistiksel analiz grafikleri. Deney öncesi vücut ağırlığı ve deney öncesi kan şeker düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır $p>0.05$. **Deney sonu vücut ağırlığı:** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $*p<0.05$. **Deney sonu kan şekeri:** Kontrol ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında $*p<0.05$.

5.1.2 Testis, Seminal vezikül, Prostat ve Epididimis ağırlık sonuçları

Testis ağırlığını ölçtüğümüz örneklerde en büyük ağırlık ortalamasının kontrol grubunda olduğunu gözlemledik. Kontrol grubu sayısal olarak takip eden çörek otu yağı, metformin ve vitamin E grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) fakat diyabet grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Gruplar arasında testis ağırlığı ortalama değerinin en düşük diyabet grubunda olduğu ve bu grup ile çörek otu yağı, metformin ve vitamin E grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edildi.

Seminal vezikül ağırlığını ölçtüğümüz örneklerde en yüksek seminal vezikül ağırlık ortalamasının kontrol grubunda olduğu tespit edilmiş olup, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı derecede bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Kontrol grubunu sayısal olarak takip eden çörek otu yağı grubu ile metformin ve vitamin E grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) fakat diyabet grubu ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Metformin ve vitamin E gruplarının ortalamalarının birbirine benzer olduğu ($p>0.05$) ve her iki grubun da diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucu ortaya çıktı.

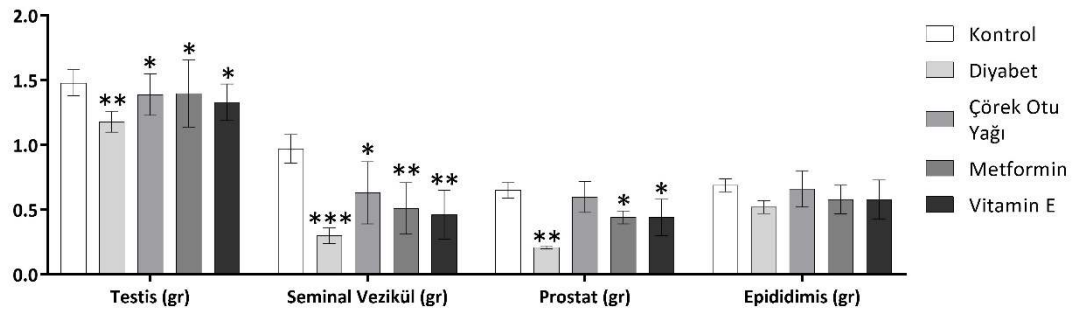
Prostat ağırlığı ölçüm örneklerinde en yüksek ağırlık ortalamasının kontrol grubunda olduğunu gözlemledik. Bu grup ile çörek otu yağı grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığını ($p>0.05$) tespit ettik. Metformin ve vitamin E gruplarının ortalamalarının da birbirine benzer olduğu ($p>0.05$) ancak her iki grubun da kontrol ve çörek otu yağı gruplarından anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Gruplar arasında prostat ağırlığı ortalama değerinin en düşük diyabet grubunda olduğu ve bu grubun geri kalan tüm gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Epididimis ağırlığı ölçümlerini istatistiksel yönden incelediğimizde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edildi.

Yukarıda işaret edilen organ ağırlıklarının istatistiksel analiz sonuçları Tablo-3 ve Şekil-17'de görülmektedir.

Tablo- 3: Testis, seminal vezikül, prostat ve epididimis ağırlığı istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	P değeri
Testis	1,48 ± 0,10 ^a	1,18±0,08 ^b	1,39 ± 0,16 ^{ab}	1,40 ± 0,26 ^{ab}	1,33 ± 0,14 ^{ab}	<0.05
Seminal Vezikül	0,97 ± 0,11 ^a	0,30±0,06 ^c	0,63 ± 0,24 ^b	0,51 ± 0,20 ^{bc}	0,46 ± 0,19 ^{bc}	<0.05
Prostat	0,65 ± 0,06 ^a	0,21±0,01 ^c	0,60 ± 0,12 ^a	0,44 ± 0,05 ^b	0,44 ± 0,14 ^b	<0.05
Epididimis	0,69 ± 0,05 ^a	0,52±0,05 ^a	0,66 ± 0,14 ^a	0,58±0,11 ^a	0,58 ± 0,15 ^a	>0.05



Şekil- 17: Grupların testis, seminal vezikül, prostat ve epididimis ağırlıklarının istatistiksel analiz sonuç grafikleri. Bar çubuklarında yer alan simgeler gruplar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir. **Testis:** Diyabet grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, tüm gruplarla karşılaştırıldığında ** $p < 0.05$. **Seminal Vezikül:** Kontrol ve diyabet gruplarıyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ** $p < 0.05$. Kontrol ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında *** $p < 0.05$. **Prostat:** Kontrol, diyabet ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, tüm gruplarla karşılaştırıldığında ** $p < 0.05$. **Epididimis:** Gruplar arasında organ ağırlığı yönünden anlamlı bir fark bulunmamaktadır $p > 0.05$.

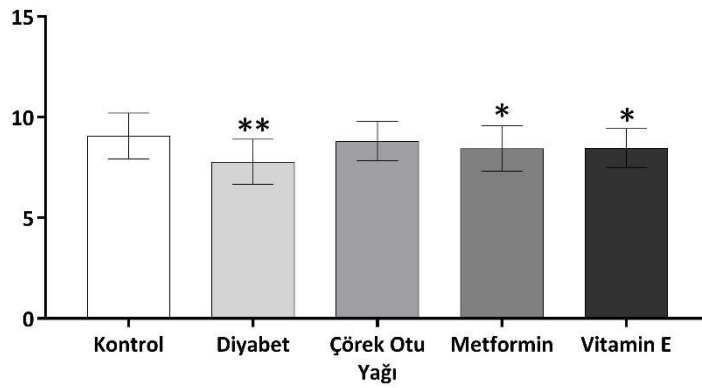
5.1.3 Johnsen biyopsi skor analizi sonuçları

Johnsen skorlaması yaptığımız örneklerde en yüksek biyopsi ortalamasının kontrol grubunda olduğunu gözlemledik. Bu grup ile çörek otu yağı grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığını ($p > 0.05$) tespit ettik. Metformin ve vitamin E gruplarının Johnsen biyopsi skor ortalamalarının yine birbirine benzer olduğu ($p > 0.05$) ancak her iki grubun da kontrol

ve çörek otu yağı gruplarından anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Gruplar arasında Johnsen biyopsi skor ortalama değerinin en düşük diyabet grubunda olduğu ve bu grubun geri kalan tüm gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edildi (Tablo-4, Şekil-18).

Tablo- 4: Grupların Johnsen Biyopsi Skor istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	P değeri
Johnsen Skor	$9,06 \pm 1,14^a$	$7,78 \pm 1,13^c$	$8,81 \pm 0,97^a$	$8,45 \pm 1,13^b$	$8,47 \pm 0,96^b$	<0.05



Şekil- 18: Grupların Johnsen Biyopsi Skor istatistik sonuç grafiği. Bar çubuklarında yer alan simgeler gruplar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir. Kontrol, diyabet ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında *** $p<0.05$** , diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında **** $p<0.05$** .

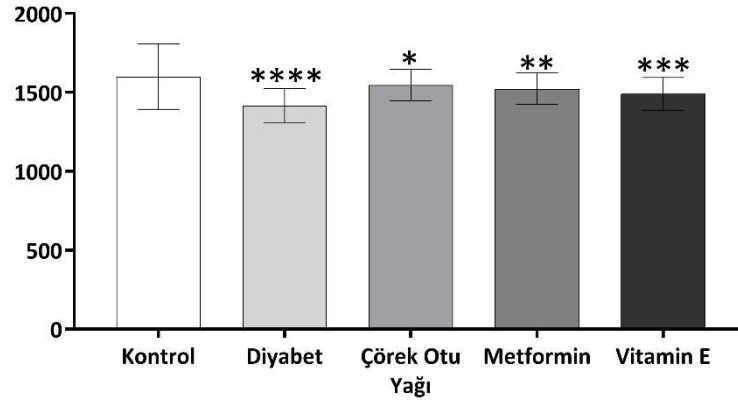
5.1.4 Seminifer tubül çapı sonuçları

Seminifer tubül çapını ölçtüğümüz örnekleri istatistiksel yönden incelediğimizde çap ortalamasının en büyük olduğu grubun kontrol grubu olduğu, sayısal olarak bu grubu takip eden çörek otu yağı grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) ancak

kontrol grubunun geri kalan tüm gruplardan daha büyük seminifer tubül çap ortalamasına sahip olduğu ($p<0.01$) sonucuna vardık. Çap genişliği yönünden çörek otu yağı takip eden metformin grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), metformin grubunun da vitamin E grubu ile benzer ortalamaoya sahip olduğu ($p>0.05$) ancak çörek otu yağı grubunun vitamin E ve diyabet grubundan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.01$) tespit edildi. Vitamin E grubunun metformin grubu hariç diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklı seminifer tubül çapına sahip olduğu ($p<0.01$), diyabet grubunun ise tüm gruplardan anlamlı derecede ($p<0.01$) daha atrofik nitelik taşıyan seminifer tubül çap ortalamasına sahip olduğu tespit edildi (Tablo-5, Şekil-19).

Tablo- 5: Grupların Seminifer Tubül çapı istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	<i>P değeri</i>
Seminifer Tubül Çapı	1598,50±206,66 ^a	1414,81±109,01 ^d	1546,01±100,03 ^{ab}	1523,25±99,66 ^{bc}	1491,43±103,48 ^c	<0.01



Şekil- 19: Grupların seminifer tubül çaplarının istatistiksel analiz sonuç grafiği. Bar çubuklarında yer alan simgeler gruplar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir. Diyabet ve vitamin E gruplarıyla karşılaştırıldığında ***p<0.01**, kontrol ve diyabet gruplarıyla karşılaştırıldığında ****p<0.01**, kontrol, diyabet ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında *****p<0.01**, bütün gruplarla karşılaştırıldığında ******p<0.01**.

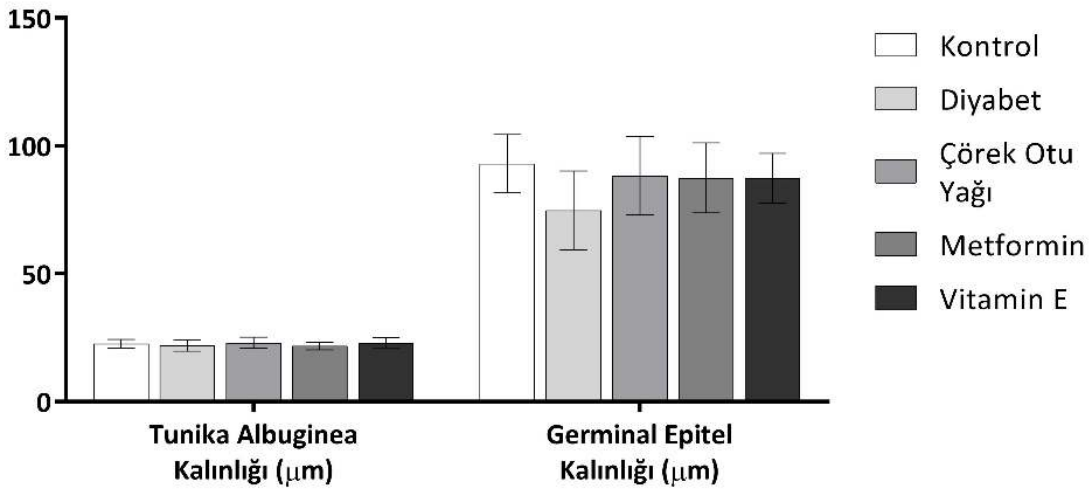
5.1.5 Tunika Albuginea ve Germinal Epitel kalınlıkları sonuçları

Tunika albuginea kalınlığı ölçümlerini istatistiksel yönden incelediğimizde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucuna varıldı.

Germinal epitel kalınlığı ölçümlerini istatistiksel yönden incelediğimizde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edildi (Tablo-6, Şekil-20).

Tablo-6: Tunika albuginea ve germinal epitel kalınlıklarının istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	P değeri
Tunika Albuginea Kalınlığı	$22,56 \pm 1,75^a$	$21,94 \pm 2,29^a$	$22,96 \pm 2,18^a$	$21,66 \pm 1,48^a$	$22,88 \pm 2,22^a$	$>0,05$
Germinal Epitel Kalınlığı	$93,10 \pm 11,30^a$	$74,80 \pm 15,43^a$	$88,26 \pm 15,27^a$	$87,45 \pm 13,70^a$	$87,34 \pm 9,71^a$	$>0,05$



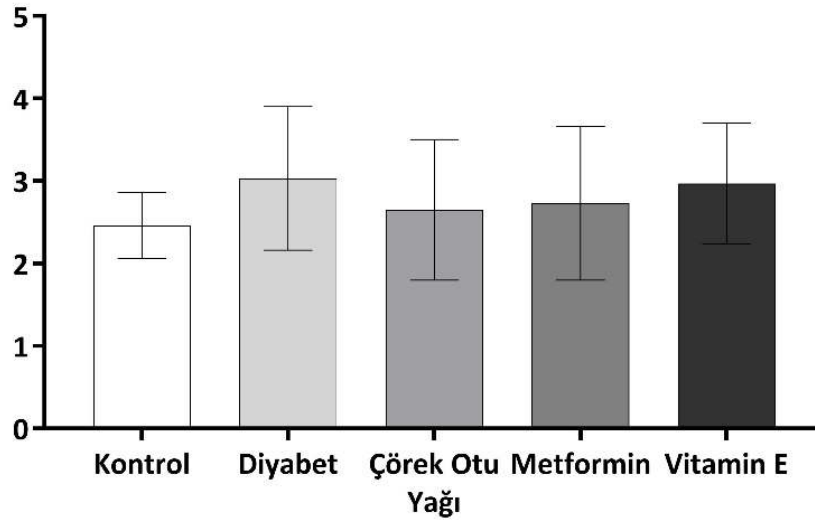
Şekil- 20: Grupların Tunika Albuginea ve Germinal Epitel kalınlıklarının istatistiksel analiz sonuç grafikleri. Gruplar arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark bulunmamaktadır $p>0.05$.

5.1.6 Bazal membran kalınlık sonuçları

Bazal membran kalınlığı ölçümlerini istatistiksel yönden incelediğimizde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucu ortaya çıktı (Tablo-7, Şekil-21)

Tablo- 7: Grupların Bazal Membran Kalınlığı istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	P değeri
Bazal Membran Kalınlığı	$2,46 \pm 0,40^a$	$3,03 \pm 0,87^a$	$2,65 \pm 0,85^a$	$2,73 \pm 0,93^a$	$2,97 \pm 0,73^a$	$>0,05$



Şekil- 21: Bazal membran kalınlığı istatistiksel analiz sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır $p>0.05$.

5.2 Spermatolojik Bulgular

5.2.1 Motilite, Konsantrasyon ve Vitalite sonuçları

Motilite ölçüm örneklerine baktığımızda, en yüksek motilite ortalamasının kontrol grubunda olduğunu gözlemledik. Aynı zamanda bu grup ile çörek otu yağı grubu arasında

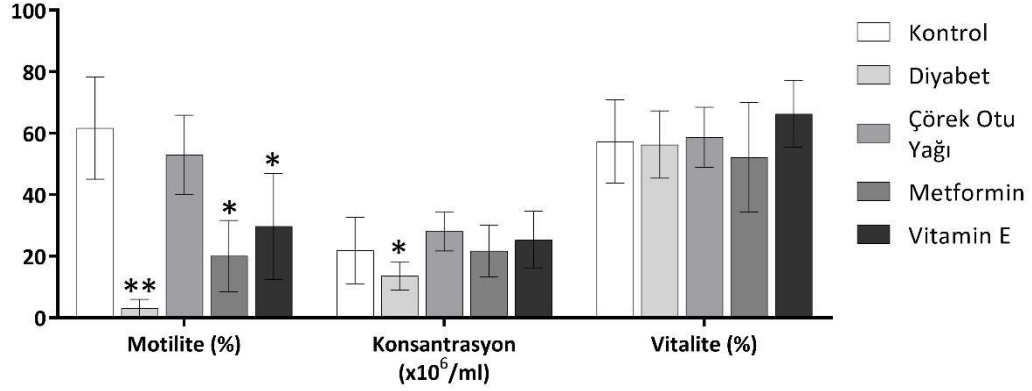
anlamli bir fark bulunmadığını ($p>0.05$) tespit edildi. Metformin ve vitamin E gruplarının motilite ortalamalarının yine birbirine benzer olduğu ($p>0.05$) fakat her iki grubun da kontrol, çörek otu yağı ve diyabet gruplarından anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Ayrıca gruplar arasında motilite ortalama değerinin en düşük diyabet grubunda olduğu ve bu grubun geri kalan tüm gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Konsantrasyon değerlendirmesini istatistiksel olarak incelediğimizde, çörek otu yağı grubunun en yüksek konsantrasyon değerine sahip olduğunu belirledik. Ayrıca çörek otu yağı grubu ile kontrol, metformin ve vitamin E grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığını ($p>0.05$) tespit edildi. Diyabet grubunun; kontrol, metformin ve vitamin E grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), fakat çörek otu yağı grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Vitalite oranı ölçümlerinin oranlarını istatistiksel yönden incelediğimizde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucu elde edildi (Tablo-8, Şekil-22).

Tablo- 8: Grupların motilite, konsantrasyon ve vitalite istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	<i>p değeri</i>
Motilite	61,67±16,63 ^a	3,00±2,97 ^c	53,00±12,88 ^a	20,00±11,64 ^b	29,67±17,22 ^b	<0.05
Konsantrasyon	21,83±10,80 ^{ab}	13,50±4,51 ^b	28,00 ± 6,32 ^a	21,67±8,36 ^{ab}	25,33±9,27 ^{ab}	<0.05
Vitalite (%)	57,33±13,56 ^a	56,33±10,93 ^a	58,67±9,77 ^a	52,17±17,79 ^a	66,33±10,88 ^a	>0.05



Şekil-22: Grupların motilite, konsantrasyon ve vitalite istatistiksel analiz sonuç grafikleri. **Motilite:** Kontrol, diyabet ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında ***p<0.05**. Tüm gruplarla karşılaştırıldığında ****p<0.05**. **Konsantrasyon:** Çörek otu yağı grubu ile karşılaştırıldığında ***p<0.05**. **Vitalite:** Gruplar arasında vitalite yönünden anlamlı bir fark bulunmamaktadır **p>0.05**.

5.2.2 Epididimal sperm baş, boyun, kuyruk ve toplam defekt sonuçları

Baş defekti analizinin istatistiksel sonucuna göre, kontrol grubu en az defekt oranına sahip olup çörek otu yağı, metformin ve vitamin E grupları ile aralarında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunmadığı sadece diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) sonucu elde edildi. Diyabet grubu ise en yüksek defekt oranına sahip olup vitamin E grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) ancak vitamin E grubu dışındaki gruplar ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Boyun defekti analizinin istatistiksel sonucuna göre, vitamin E grubu en az defekt oranına sahip olup kontrol, çörek otu yağı ve metformin ile aralarında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunmadığı sadece diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) sonucu elde edildi. Diyabet grubu ise en yüksek defekt oranına sahip olup metformin grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) ancak metformin grubu dışındaki gruplar ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

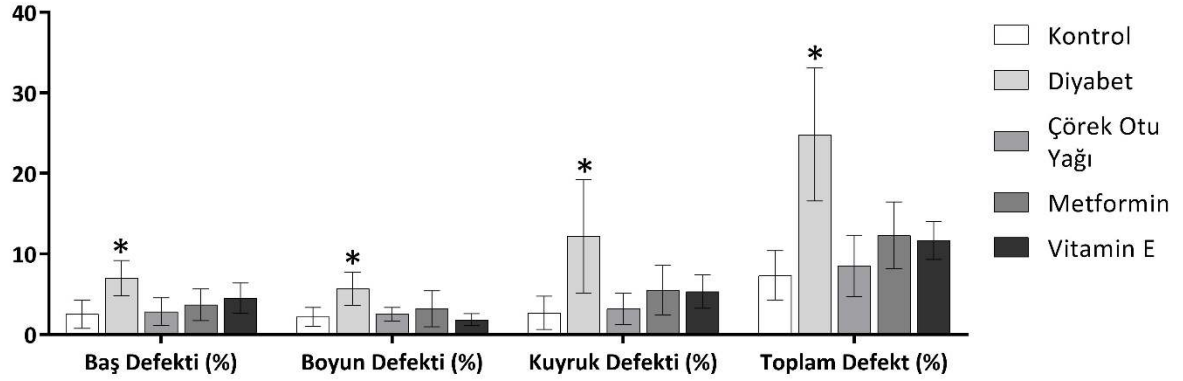
Kuyruk defekti analizinin istatistiksel sonucuna göre, kontrol grubu en az defekt oranına sahip olup çörek otu yağı, metformin ve vitamin E grupları ile aralarında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunmadığı sadece diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunduğu

($p<0.05$) sonucu elde edildi. Ayrıca diyabet grubu ile tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Toplam defekt analizinin istatistiksel sonucuna göre, kontrol grubu en az defekt oranına sahip olup çörek otu yağı, metformin ve vitamin E grupları ile aralarında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunmadığı sadece diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) sonucu elde edildi. Ayrıca diyabet grubu ile tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi (Tablo-9, Şekil-23).

Tablo- 9: Grupların epididimal sperm baş, boyun, kuyruk ve toplam defekt istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	<i>p değeri</i>
Baş Defekti	2,50 ± 1,76 ^a	7,00 ± 2,19 ^b	2,83 ± 1,72 ^a	3,67 ± 1,97 ^a	4,50±1,87 ^{ab}	<0.05
Boyun Defekti	2,17 ± 1,17 ^a	5,67 ± 2,07 ^b	2,50 ± 0,84 ^a	3,17±2,23 ^{ab}	1,83 ± 0,75 ^a	<0.05
Kuyruk Defekti	2,67 ± 2,07 ^a	12,17±7,05 ^b	3,17 ± 1,94 ^a	5,50 ± 3,08 ^a	5,33 ± 2,07 ^a	<0.05
Toplam Defekt	7,33 ± 3,08 ^a	24,83±8,26 ^b	8,50 ± 3,83 ^a	12,33±4,13 ^a	11,67±2,34 ^a	<0.05



Şekil- 23: Grupların epididimal sperm baş, boyun, kuyruk ve toplam defekt oranlarının istatistiksel sonuç grafikleri. **Baş defekti:** Kontrol, çörek otu yağı ve metformin gruplarıyla karşılaştırıldığında $*p<0.05$. **Boyun defekti:** Kontrol, çörek otu yağı ve Vitamin E gruplarıyla karşılaştırıldığında $*p<0.05$. **Kuyruk defekti:** Tüm gruplarla karşılaştırıldığında $*p<0.05$. **Toplam defekt:** Tüm gruplarla karşılaştırıldığında $*p<0.05$.

5.3 Histopatolojik Bulgular

5.3.1 Kontrol grubu histopatolojik bulguları

H&E ile boyanan kontrol grubu testis kesitlerinde; çoğu düzenli ve yuvarlak seminifer tubüller izlendi. Tubülleri birbirinden ayıran interstisyel doku içinde kapiler damara ve asidofilik sitoplazmalı poligonal Leydig hücreleri seçildi. Tubüller bazal membran üzerinde ovoid çekirdekli Sertoli ve spermatogenik hücre tabakaları izlendi (Resim-8).

Testisler, dıştan tunika albuginea ile sarılıydı. Seminifer tubüllerin etrafında çok ince kollejen lifler izlendi (Resim-9). Spermatogenik hücre tabakası; spermatogonia, spermatosit, spermatid ve matur spermillerden oluşmaktaydı. En büyük spermatogenik hücreler primer spermatositlerdi (Resim-10).

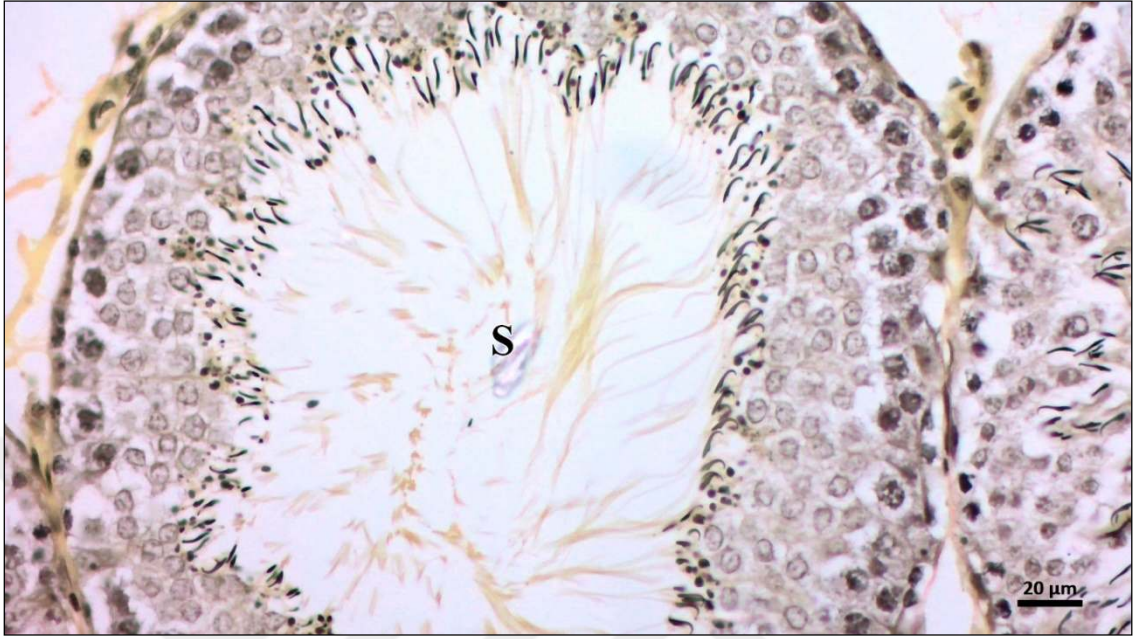
PAS ile boyanan kesitlerde seminifer tubül bazal membranları normal kalınlıkta izlendi (Resim-11).



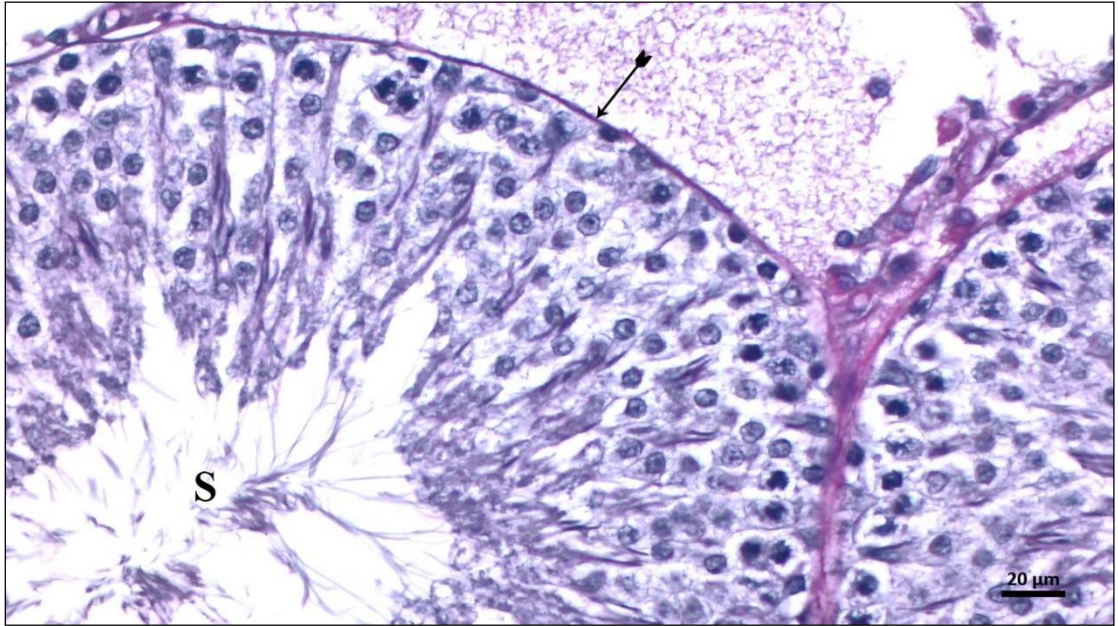
Resim- 8: Kontrol grubu testis kesitinde normal yapıda seminifer tubüller (S) ve tunika albuginea (→)izlenmektedir, (H-E, Bar: 50 µm).



Resim- 9: Kontrol grubu testis kesitinde normal histolojik yapıda seminifer tubüller (S) , (Van-Gieson, Bar: 50 µm).



Resim- 10: Kontrol grubu testis kesitinde spermatogenezin tüm aşamalarını yansıtan bir seminifer tubül (S) görünümü, (Van-Gieson, Bar: 20 µm).



Resim- 11: Kontrol grubu testis kesitinde normal yapıda seminifer tubül (S) ve bazal membran (→)görüldüğü, (PAS, Bar: 20 µm).

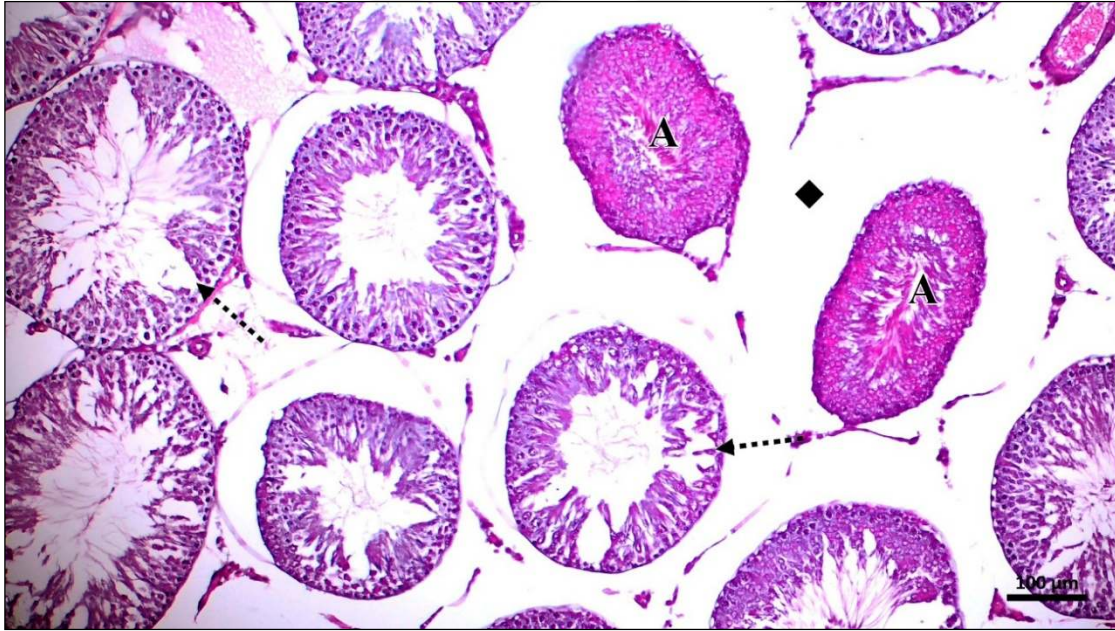
5.3.2 Diyabet grubu histopatolojik bulguları

Bu gruptaki tüm testis kesitlerinde seminifer tubüllerde düzensizlik, dejenerasyon ve atrofik tubüller izlendi. Sertoli ve spermatogenik hücrelerin bazal membranlarının ayrıldığı, tubül lumenine deskuame olduğu izlendi (Resim-12).

Geniş interstisyel alanlarda ödem, konjesyon ve damarlarda dilatasyon izlenirken leydig hücrelerinde ise histolojik bir değişiklik gözlenmedi. Bazı seminifer tubül lumenine deskuame olmuş germinal epitel hücrelerine rastlandı (Resim-13-14).

Bazı tubüllerde birbirlerinden yer yer ayrılan dejenere spermatogenik hücreler ve aralarında oluşan ödematöz boşluklar izlendi. Ayrıca bazı tubüllerin germinal epitelinde incelme yanı sıra lumene yakın çok çekirdekli dev hücreler görüldü (Resim-15).

Bazı tubüllerin bazal membranlarında ondülasyon ve kalınlaşma, yanı sıra diffüz interstisyel ödem ve seminifer tubüllerde perforasyon izlendi (Resim-16-17).



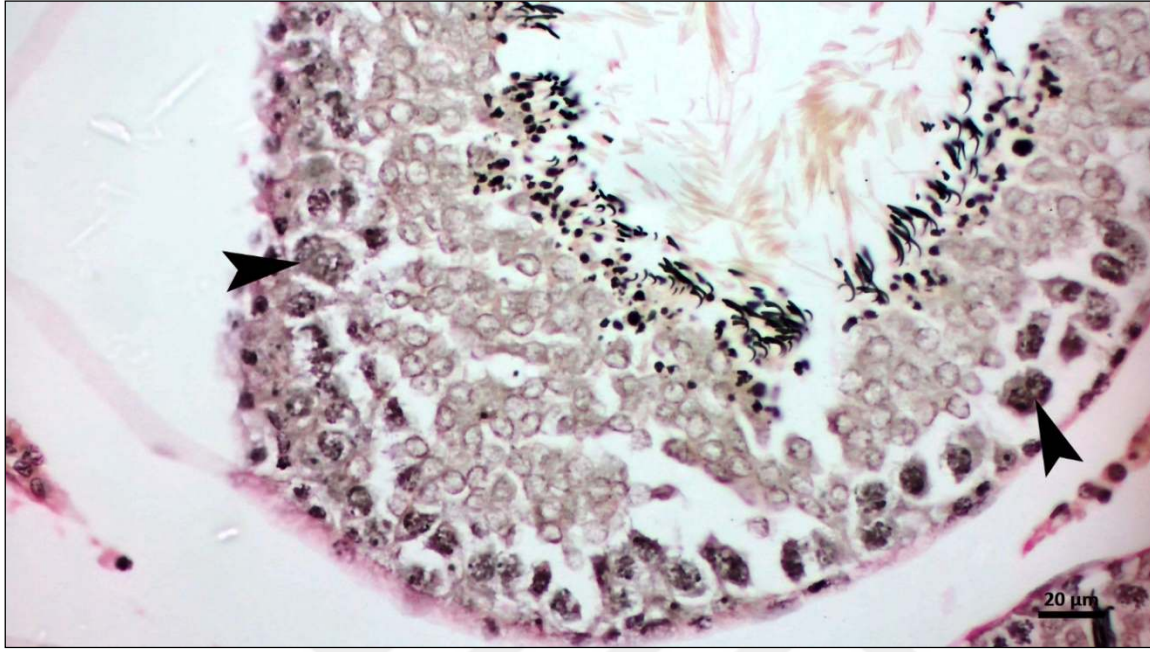
Resim- 12: Diyabet grubu testis kesiti. Atrofik tubül (A), hasarlanmış tubüller (--->)ve interstisyel ödem (♦) izlenmektedir, (H-E, Bar: 100 µm).



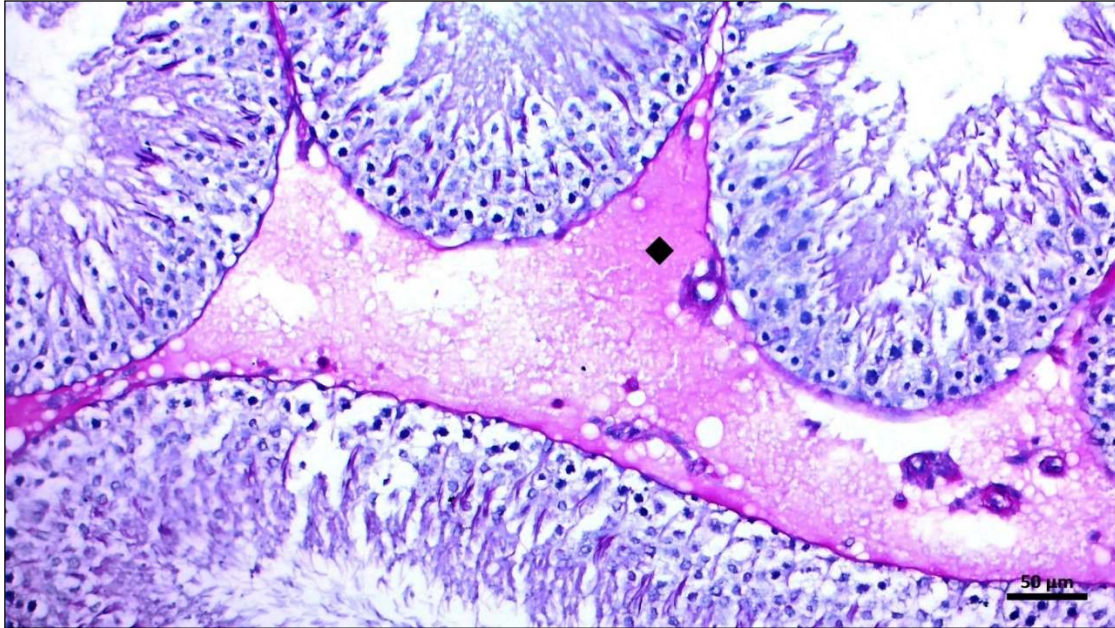
Resim- 13: Diyabet grubu testis kesiti. Damar konjesyonu ve dilatasyon (⇔), bazal membran ayrılmaları (→) ve interstisyel alanda ödem (Δ) izlenmektedir, (H-E, Bar: 100 μm).



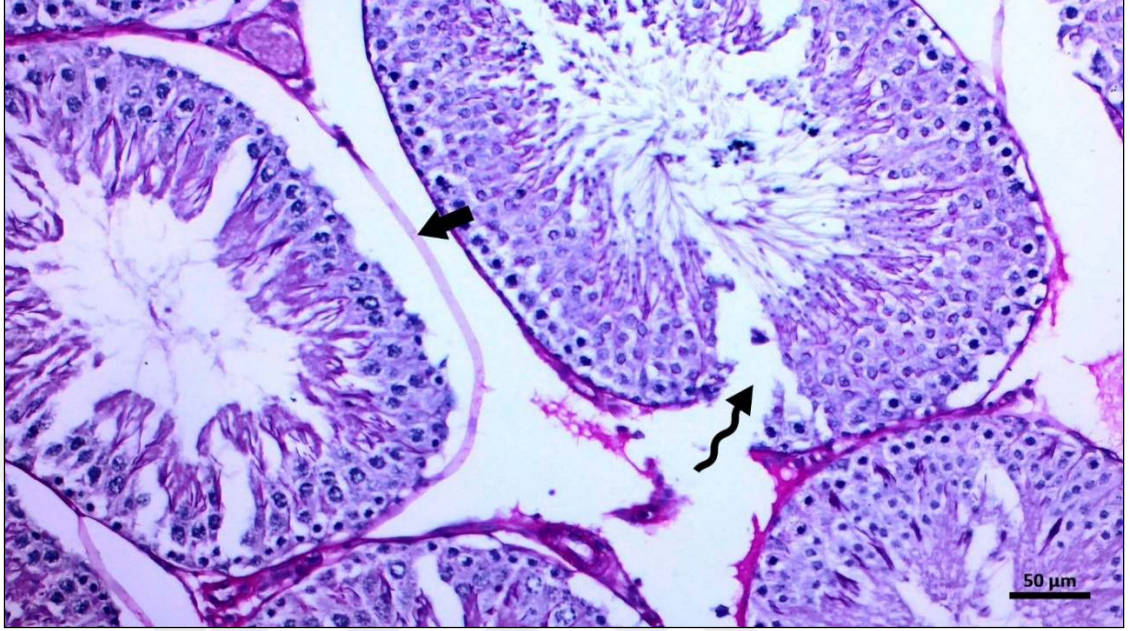
Resim- 14: Diyabet grubu testis kesitinde seminifer tubül lumenine deskuame olmuş hücreler (*), (H-E, Bar: 50 μm).



Resim- 15: Diyabet grubu testis kesitinde multinükleer dev hücreler (➤) izlenmektedir, (Van-Gieson, Bar: 20 µm).



Resim- 16: Diyabet grubu testis kesitinde diffüz interstisyel ödem (◆), (PAS, Bar: 50 µm).



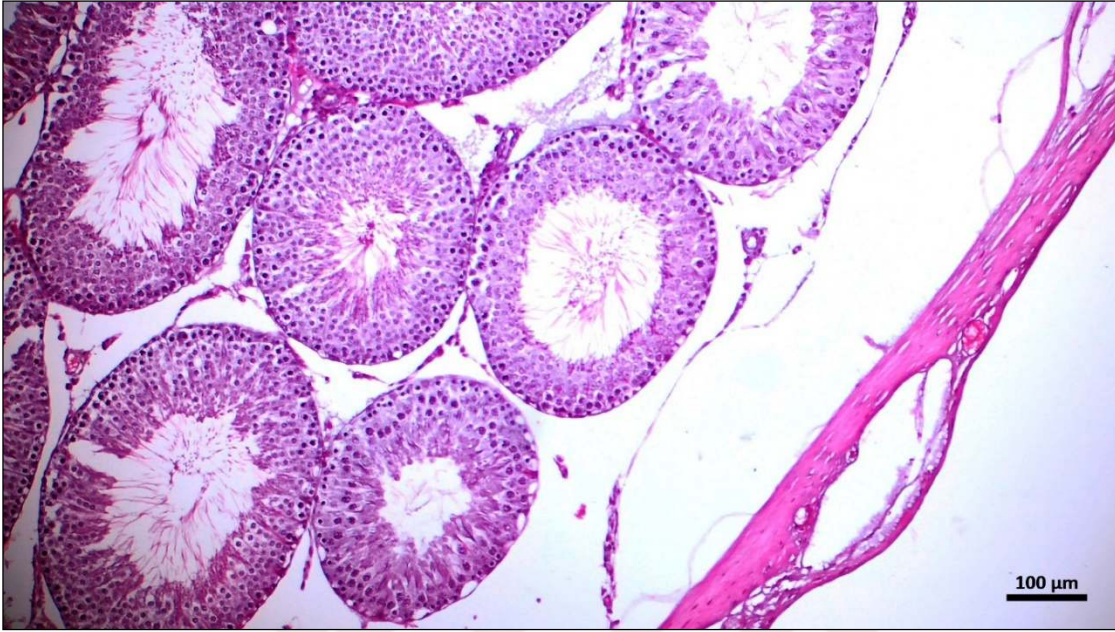
Resim- 17: Diyabet grubu testis kesiti. Bazal membran ayrılmaları (➔) ve seminifer tubülde perforasyon (~>), (PAS, Bar: 50 µm).

5.3.3 Diyabet + Çörek Otu Yağı grubu histopatolojik bulguları

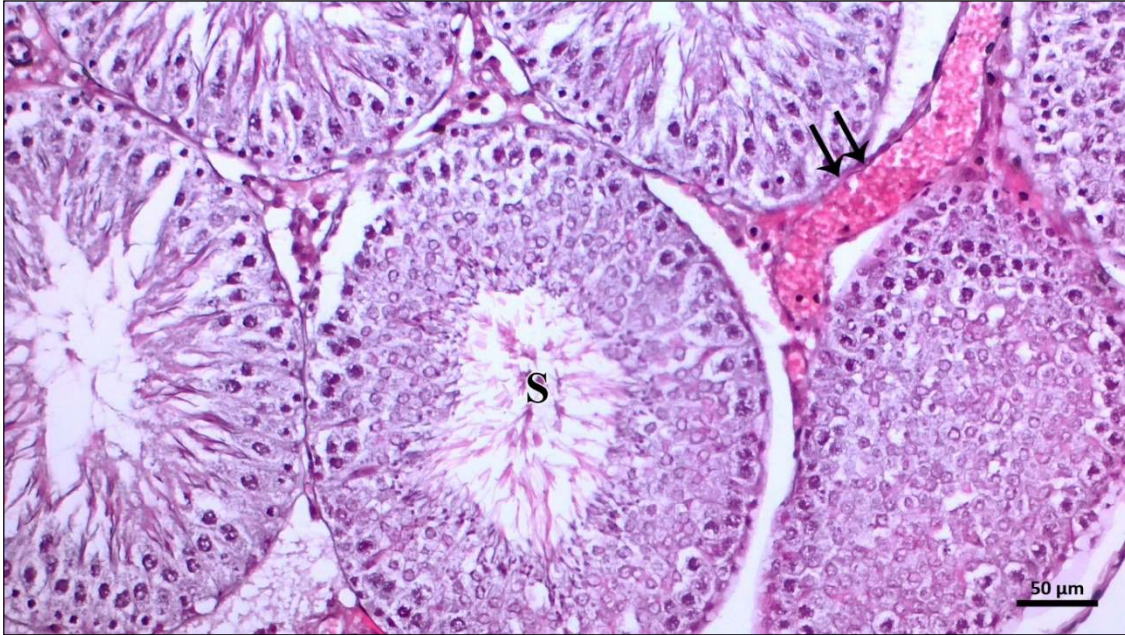
Bu deney grubunun H&E ile boyanan testis kesitlerinde: interstisiyel alanda minimal düzeyde ödem ve konjesyon dışında Leydig hücreleri sayısında artış gözlemlendi. (Resim-18-19).

Bu grupta incelenen testis kesitlerinde testiküler hasar çok hafifti. Seminifer tubüller kompakt yapıda ve spermatogenetik hücrelerden spermatositler ve matur spermatozoon sayısında belirgin bir artış izlendi (Resim-20-21).

PAS ile boyanan testis kesitlerinde seminifer tubül bazal membranları kontrol grubunun benzer normal kalınlıkta izlendi. (Resim-22-23).



Resim- 18: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti. Kontrol grubuna benzer seminifer tubüller izlenmektedir (H-E, Bar: 100 µm).



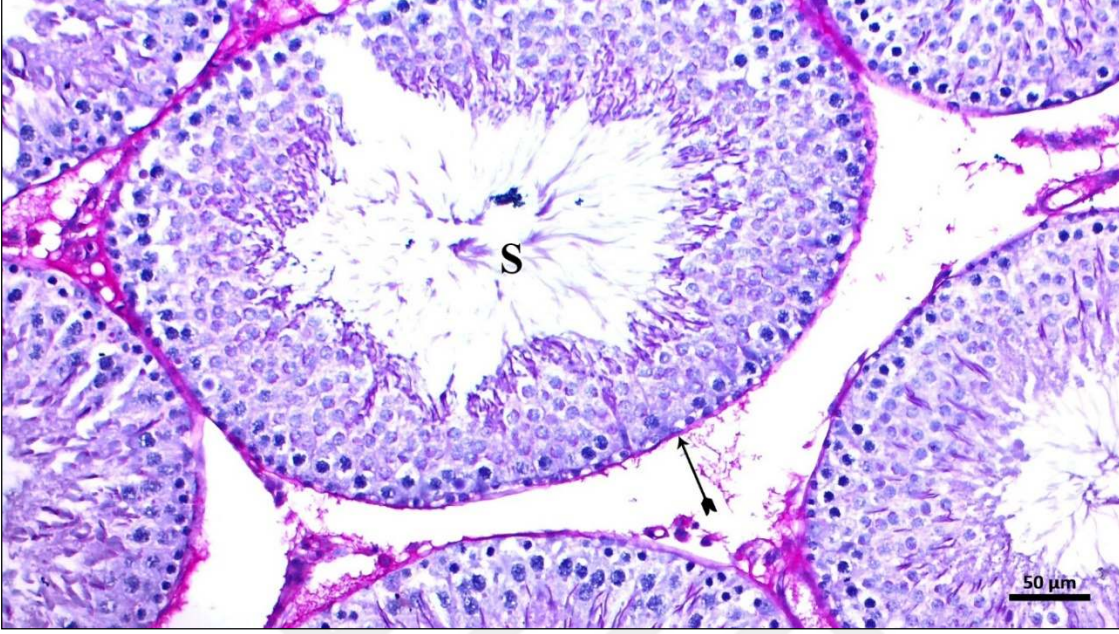
Resim- 19: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti. Kontrol grubuna benzer seminifer tubüller (S) ve damar konjesyonu (⇔) izlenmektedir, (H-E, Bar: 50 µm).



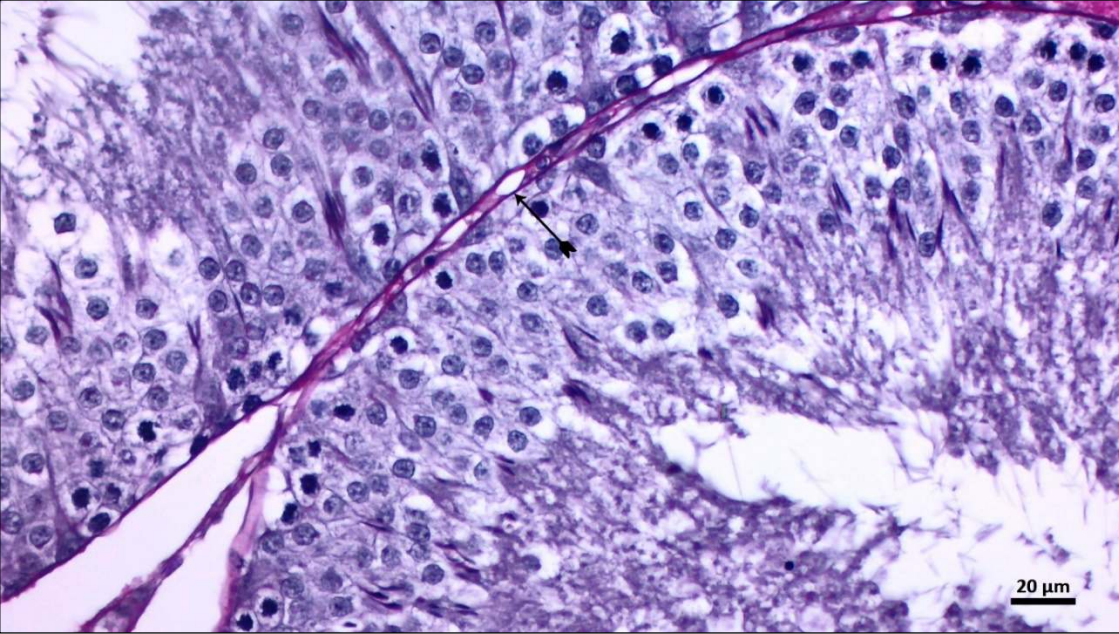
Resim- 20: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti. Kontrol grubuna benzer spermatogenezin tüm aşamalarını içeren seminifer tubüller (S), (Van-Gieson, Bar: 50 µm).



Resim- 21: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti. Kontrol grubuna benzer seminifer tubül (S) ve tunika albuginea (→) görülüyor, (Van-Gieson, Bar: 50 µm).



Resim- 22: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti. Kontrol grubuna benzer seminifer tubül (S) ve bazal membranlar (►→) görülüyor, (PAS, Bar: 50 µm).



Resim- 23: Diyabet + çörek otu yağı grubu testis kesiti. Kontrol grubuna benzer normal kalınlıkta bazal membranlar (►→) görülüyor, (PAS, Bar: 20 µm).

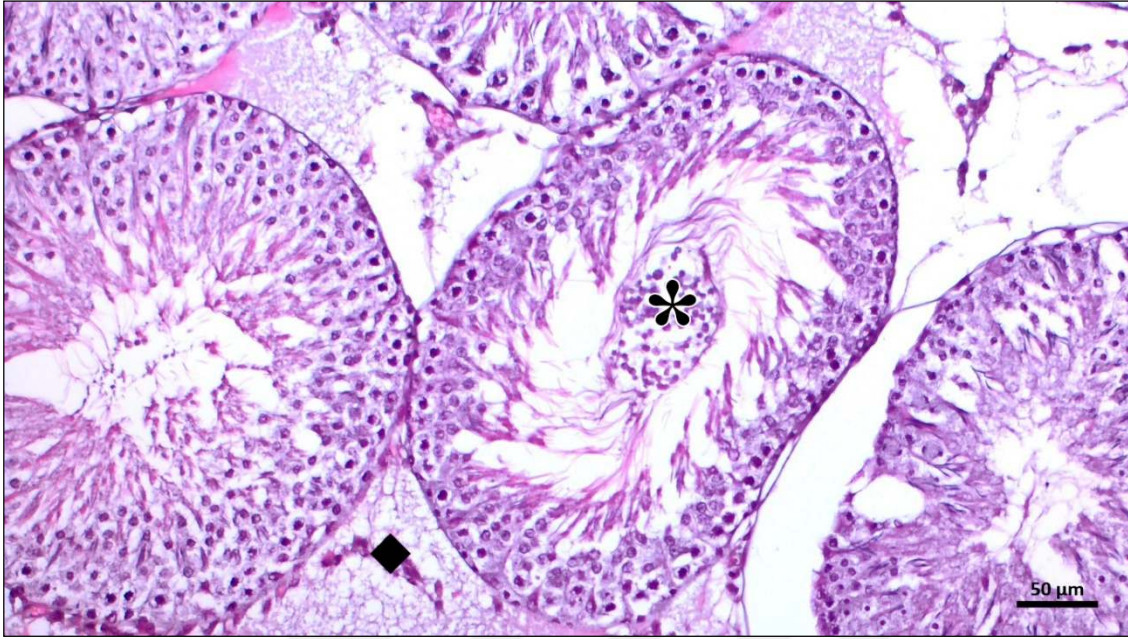
5.3.4 Diyabet + Metformin grubu histopatolojik bulguları

Hematoksilen-Eozin ile boyanan testis kesitlerinde: normal histolojik yapı gösteren seminifer tubüllerin yanı sıra lumene deskuame olmuş dejenere spermatogenik hücreler, damarlarda konjesyon ve interstisyel ödem izlendi (Resim-24-25).

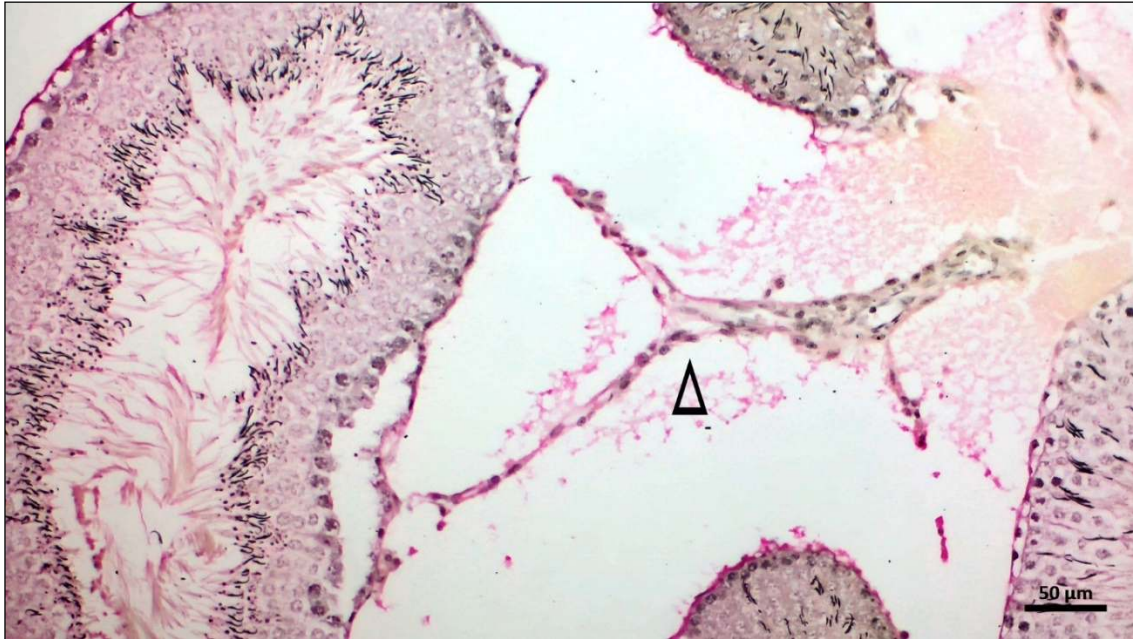
Ayrıca perivasküler kollajen lif akümüasyonu (Resim-26) yanı sıra PAS ile boyanan testis kesitlerinde seminifer tubül bazal membranlarında nispi kalınlaşma izlendi. (Resim-27).



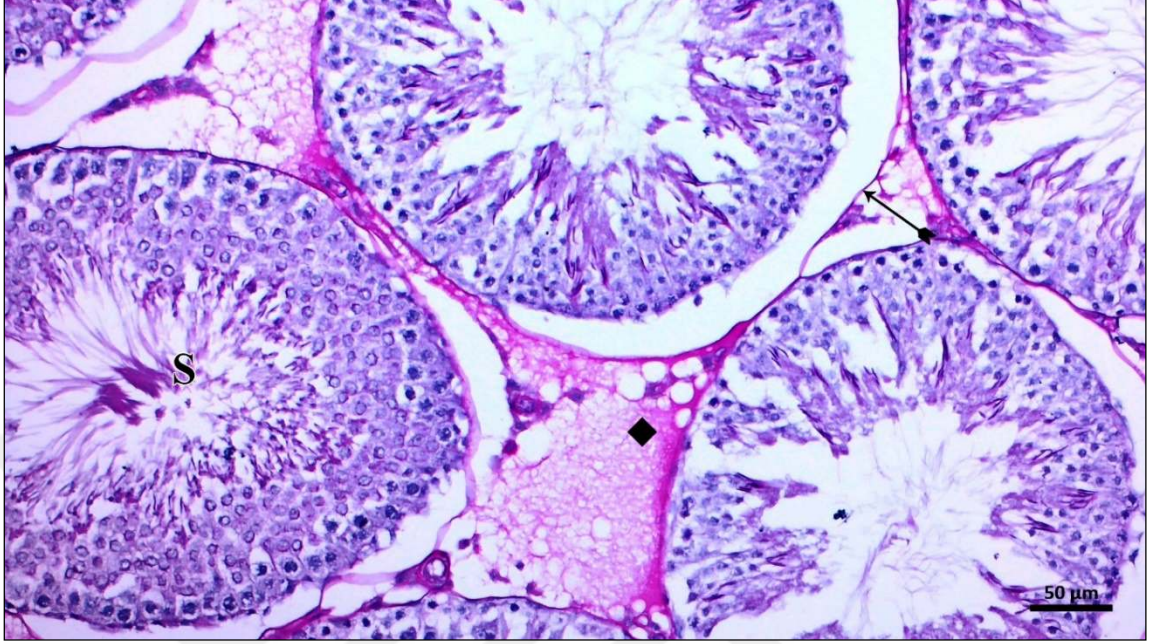
Resim- 24: Diyabet + metformin grubu testis kesitinde damar konjesyon ve dilatasyon (→) ve hasarlanmış tubül (---→), (H-E, Bar: 50 µm).



Resim- 25: Diyabet + metformin grubu testis kesiti. Lumene deskuame olan hücreler (*) ve interstisyel ödem (◆) görülüyor, (H-E, Bar: 50 µm).



Resim- 26: Diyabet + metformin grubu testis kesitinde interstisyel alanda genişlemeler (Δ), (Van-Gieson, Bar: 50 µm).

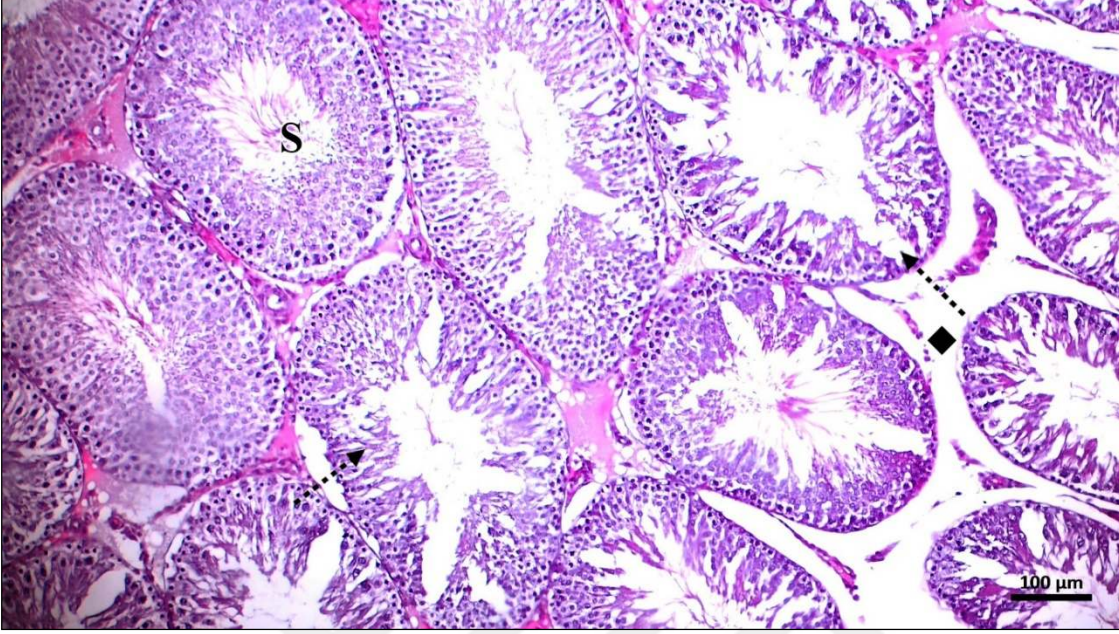


Resim- 27: Diyabet + metformin grubu testis kesiti. Bazal membran ayrılmaları (➤→), bir kısmı korunmuş seminifer tubül (S) ve interstisyel ödem (♦), (PAS, Bar: 50 µm).

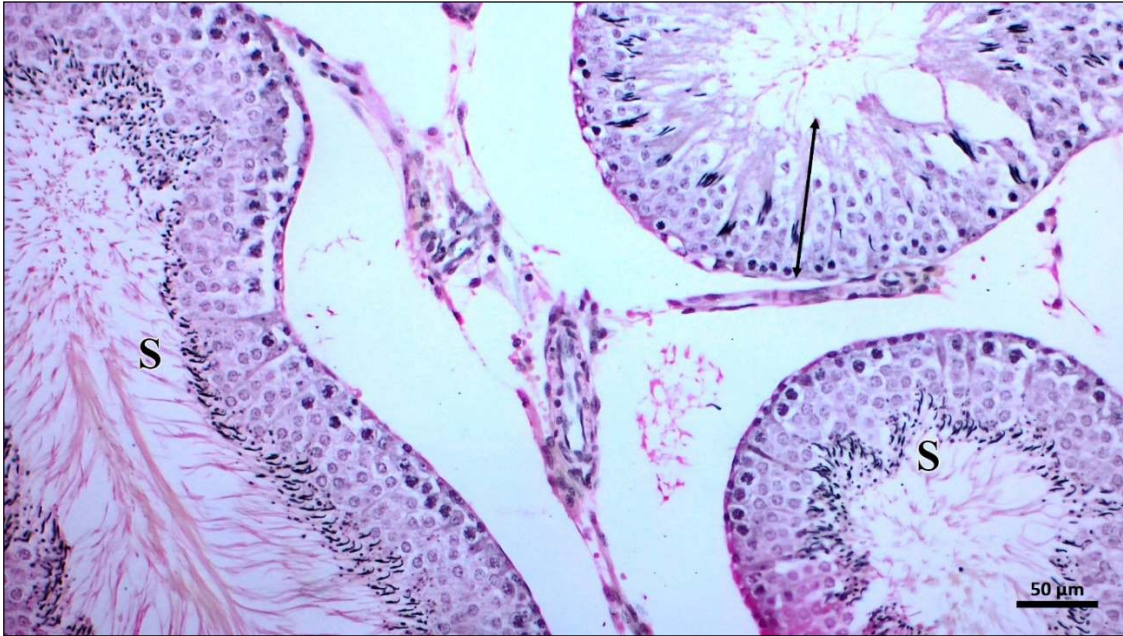
5.3.5 Diyabet + Vitamin E grubu histopatolojik bulguları

Bu grubun testis tubüllerinde atrofik değişiklikler diyabet grubuna göre daha hafifti. Bazı normal görünümlü seminifer tubüllerin yanı sıra bazal membrandan ayrılmış disorganizasyon gösteren spermatogenetik hücrelere rastlandı (Resim-28-29).

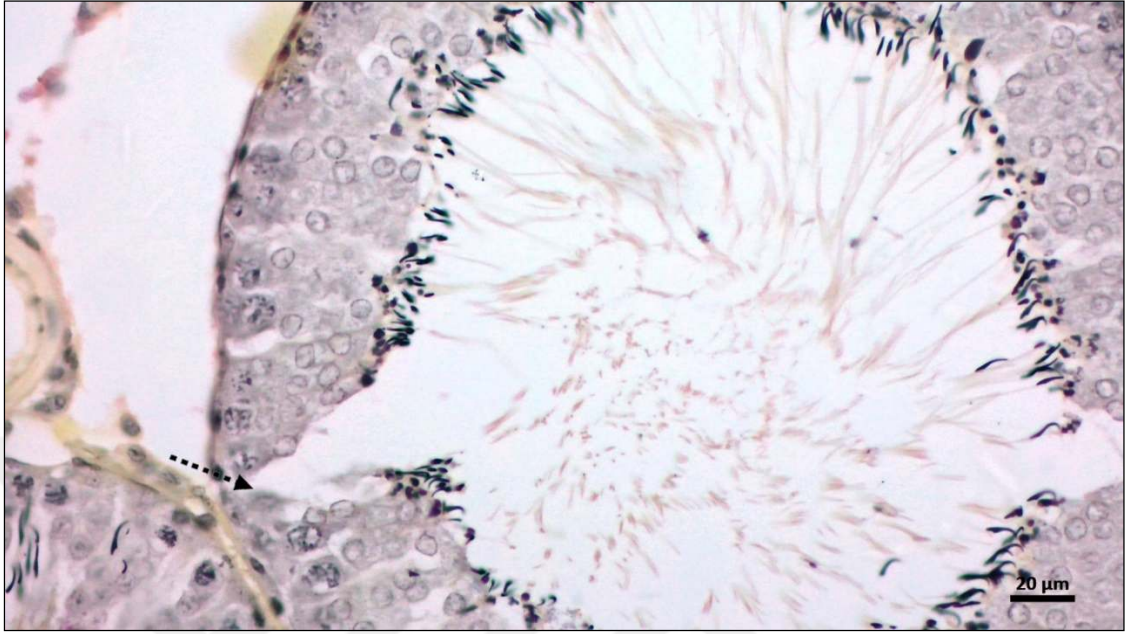
Seminifer tubüller etrafında ince kollajen lif demetleri (Resim-30), PAS ile boyanan testis kesitlerinde ise nispeten kalın izlenen seminifer tubül bazal membranları izlendi (Resim-31).



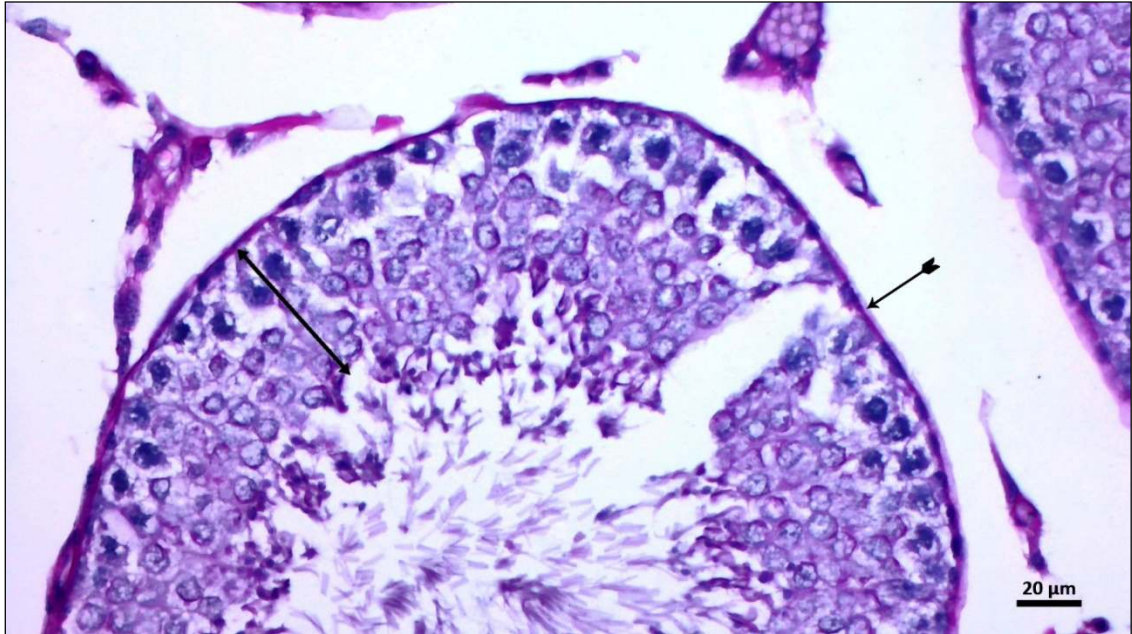
Resim- 28: Diyabet + vitamin E grubu testis kesit. Normal tubül (S) yanı sıra hasarlanmış tubül (↔) ve interstisyel ödem (◆) (H-E, Bar: 100 μm).



Resim- 29: Diyabet + vitamin E grubu testis kesiti. Bir kısmı korunmuş seminifer tubül (S) yanı sıra spermatogenezde düzensizlik (↔), (H-E, Bar: 50 μm).



Resim- 30: Diyabet + vitamin E grubu testis kesitinde hasarlanmış seminifer tubül (--->), (Van-Gieson, Bar: 20 µm).



Resim- 31: Diyabet + vitamin E grubu testis kesiti. Bazal membranda kalınlaşma (↔) ve spermatogenezde düzensizlik (↔), (PAS, Bar: 20 µm).

5.4 Grupların immunohistokimya ve TUNEL Assay Bulguları

5.4.1 PCNA immunohistokimya bulguları

PCNA analizin pozitif sinyal veren hücre çekirdeklerinin toplam çekirdeklere oranının sonuçlarını istatistiksel olarak incelediğimizde kontrol grubunun en yüksek ortalama değere sahip olduğunu belirledik. Ayrıca kontrol grubu ile çörek otu yağı grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucu elde edildi. Fakat kontrol grubunun çörek otu yağı grubu dışındaki gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Çörek otu yağı grubu ise vitamin E grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), fakat metformin ve diyabet grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Vitamin E grubu ile metformin ve diyabet grupları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Metformin grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) ayrıca diyabet grubunun da diğer gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (Tablo-10, Resim: 32-36, Şekil-24).

Tablo- 10: Grupların PCNA immunohistokimya istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	<i>p değeri</i>
PCNA	50,57± 6,31 ^a	24,29±4,00 ^d	46,94 ± 7,15 ^{ab}	38,17 ± 9,58 ^c	43,26 ± 9,82 ^b	<0.05

Kontrol grubu testis kesitlerini incelediğimizde seminifer tubüllerde spermatogenezisin her aşamasındaki hücrelerde PCNA ekspresyonu olduğu tespit edildi (Resim-32).

Diyabet grubu testis kesitleri incelendiğinde, spermatogonialarda PCNA pozitif ve tubüllerin çok büyük bir kısmında gözlenen germinal epitelde spermatogenezis safhalarındaki hücrelerde ise PCNA negatif ekspresyonu izlendi. (Resim-33).

Diyabet+çörek otu yağı grubu testis kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna benzer şekilde spermatogenezisin her aşamasında PCNA pozitif ve PCNA negatif ekspresyonu gözlemlendi (Resim-34).

Diyabet+metformin grubu testis kesitlerinde spermatogenezisin farklı aşamalarındaki hücrelerde diyabet grubuna oranla daha fazla PCNA pozitif ekspresyonu izlendi (Resim-35).

Diyabet+vitamin E grubu testis kesitlerinde spermatogenezisin farklı aşamalarındaki hücrelerde diyabet grubuna oranla daha fazla PCNA pozitif ekspresyonu izlendi (Resim-36).



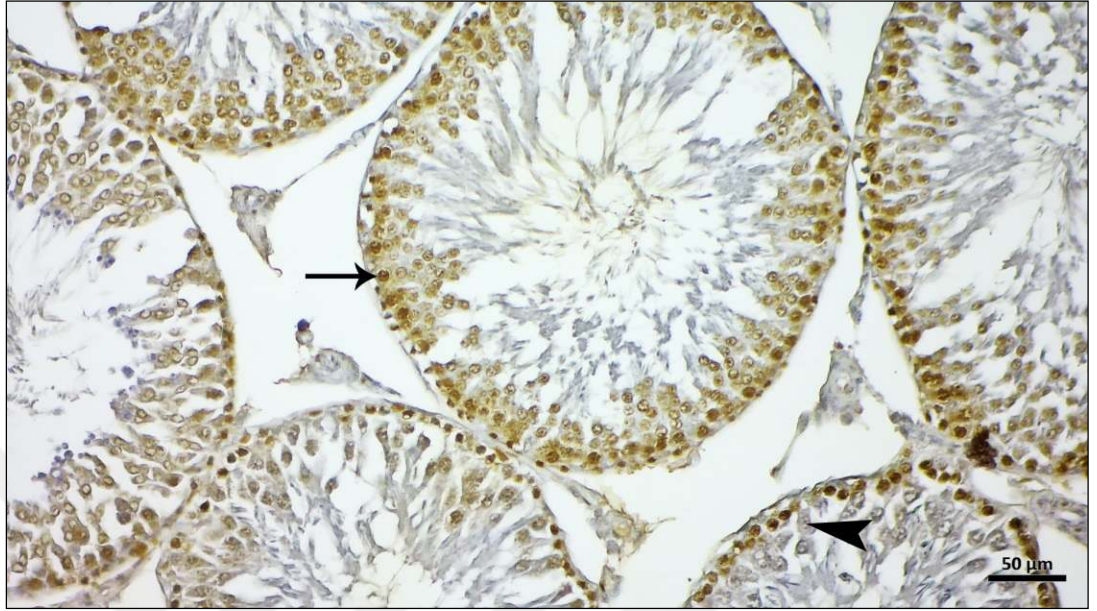
Resim- 32: Kontrol grubu PCNA immunohistokimya mikrosafı. Kontrol grubunda seminifer tubüllerin büyük bir kısmında gözlemlenen germinal epitelin tüm saflarında PCNA pozitif (ok) hücreler. Yer yer bazı seminifer tubüllerde germinal epitelde spermatogonia ve bazal hücreler dışındaki kalan germinal epitel hücrelerinde PCNA negatif (ok başı) durumu. **Boyama:** PCNA immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



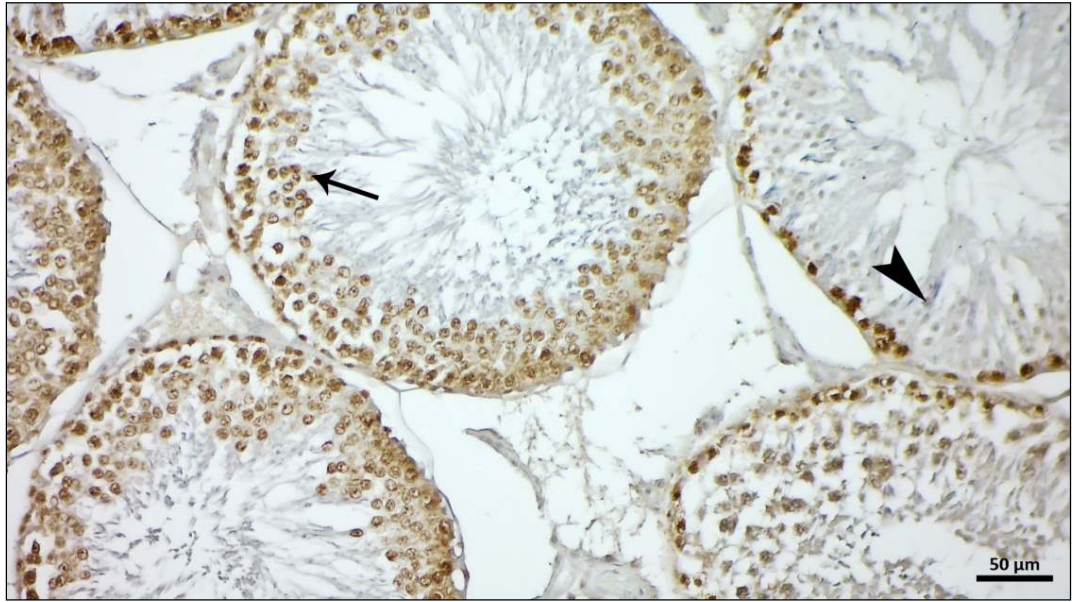
Resim- 33: Diyabet grubu PCNA immunohistokimya mikrosafı. Diyabet grubundaki hayvanların testis dokularında germinal epitelde spermatogonialarda PCNA pozitiflik (ok) ve tubüllerin çok büyük bir kısmında gözlenen germinal epitel de spermatogenezis safhalarındaki hücrelerde PCNA negatiflik (ok başı). **Boyama:** PCNA immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 34: Çörek otu yağı grubu PCNA immunohistokimya mikrosafı. Çörek otu yağı grubunda germinal epitelde kontrol grubuna benzerşekilde germinal epitelde PCNA pozitif (ok) hücreler. Tubüllerin bazılarında spermatogonia dışındaki germinal epitel hücreleri PCNA yönünden negatif (ok başı) izlenmektedir. **Boyama:** PCNA immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 35: Metformin grubu PCNA immunohistokimya mikrografı. Metformin grubunda germinal epitel düzleminde PCNA pozitif (ok) ve negatif (ok başı) hücrelerin dağılımı. **Boyama:** PCNA immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 36: Vitamin E grubu PCNA immunohistokimya mikrografı. Vitamin E grubunda spermatogenezis gerçekleştiren germinal epitel hücrelerinde pozitif (ok) ve negatif (ok başı) hücreler. **Boyama:** PCNA immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

5.4.2 Caspase-3 immunohistokimya bulguları

Caspase-3 analiz örneklerinde seminifer tubüllerin pozitif sinyallerinin toplam doku alanına oranının istatistiksel sonuçlarına göre; kontrol grubu diğer gruplara göre en düşük ortalama değere sahip olup diğer tüm gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Vitamin E ve çörek otu yağı grubu ortalama değerleri birbirine benzer olup aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), fakat vitamin E ile kalan diğer gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Çörek otu yağı grubunun ise vitamin E grubu ve metformin grubu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$), ancak kontrol grubu ve diyabet grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) sonucuna varıldı. Metformin grubunun, çörek otu yağı grubu dışındaki tüm gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Diyabet grubu da en büyük ortalama değere sahip olup diğer tüm gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) sonucuna varıldı (Tablo-11, Resim:37-41, Şekil-24).

Tablo- 11: Grupların Caspase-3 immunohistokimya istatistiksel analiz değerleri

Kontrol	Diyabet	Çörek otu yağı	Metformin	Vitamin E	<i>p değeri</i>
2,92 ± 1,54 ^a	15,84 ± 1,68 ^d	4,59 ± 0,67 ^{bc}	5,05 ± 0,88 ^c	4,40 ± 0,47 ^b	<0.05

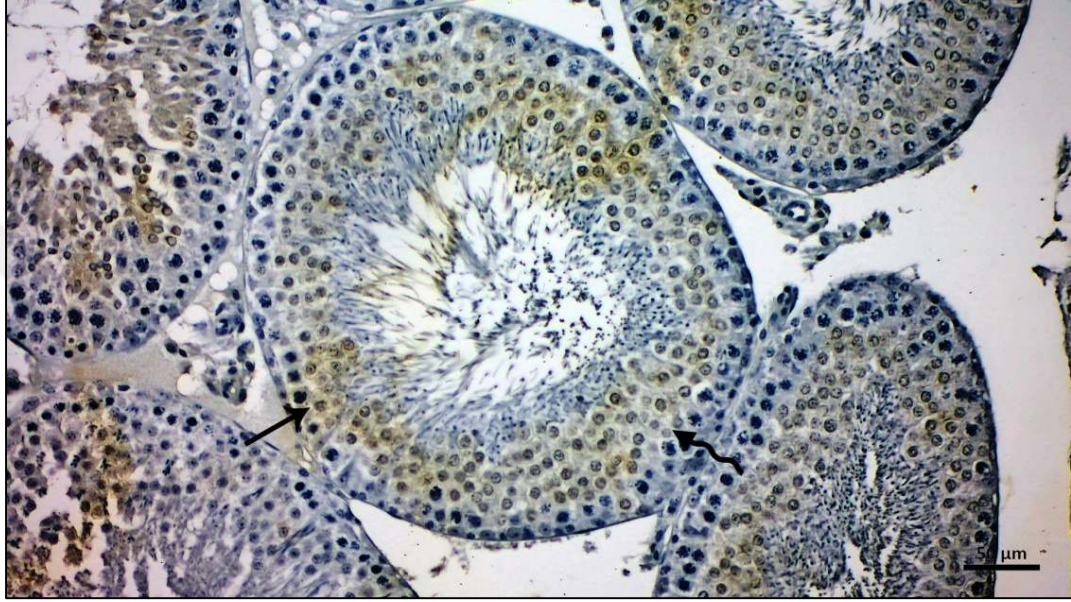
Kontrol grubu testis kesitlerinde seminifer tubüllerde caspase-3 ekspresyon düzeyinin zayıf olduğu tespit edildi. Aynı zamanda seminifer tubüllerin yapısının düzgün olduğu izlendi (Resim-37).

Diyabet grubu testis kesitleri incelendiğinde, seminifer tubüllerde yoğun Caspase-3 ekspresyonu izlendi. Ayrıca seminifer tubül yapısında bozulmalar tespit edildi (Resim-38).

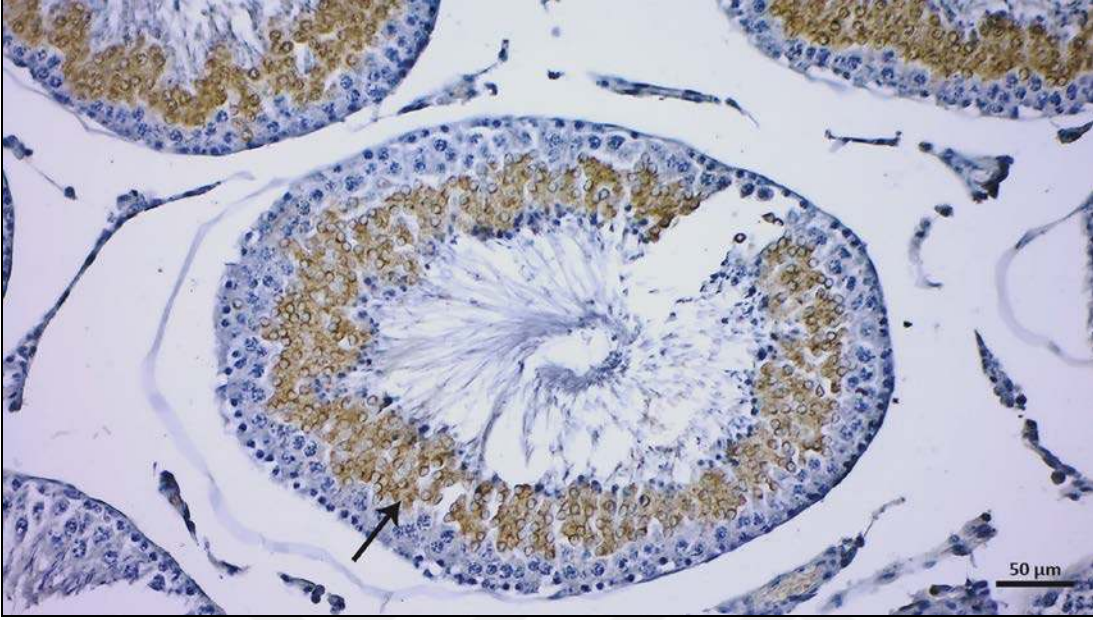
Diyabet+çörek otu yağı grubu testis kesitleri incelendiğinde seminifer tubüllerde Caspase-3 ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha fazla izlendi (Resim-39).

Diyabet+metformin grubu testis kesitlerinde diyabet grubuna göre seminifer tubüllerde daha az Caspase-3 ekspresyonunun izlendi (Resim-40).

Diyabet+vitamin E grubu testis kesitlerinde diyabet grubuna göre seminifer tubüllerde daha az Caspase-3 ekspresyonunun izlendi (Resim-41).



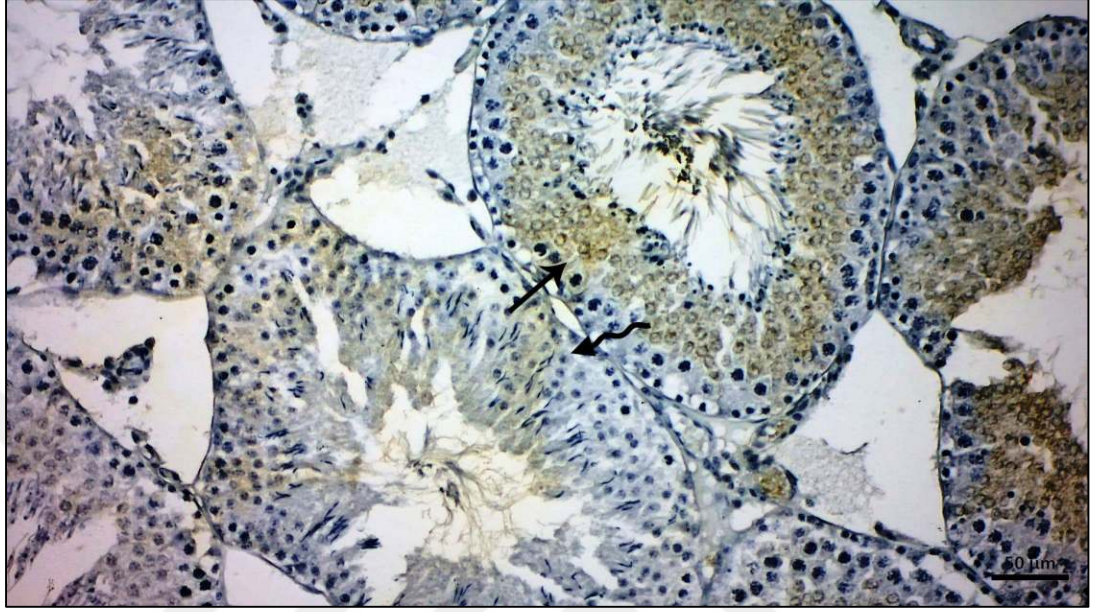
Resim- 37: Kontrol grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrosafı. Kontrol grubunda seminifer epitel hücrelerinde düşük düzeyde caspase-3 immunopozitif (ok) ve yoğun negatif (kıvrımlı ok) alanlar. **Boyama:** Caspase-3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.



Resim- 38: Diyabet grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofrafı. Diyabet grubunda seminifer epitel hücrelerinde oldukça yoğun caspase-3 (ok) alanlar immunoekspresyonda artışa işaret etmektedir. **Boyama:** Caspase-3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 39: Çörek otu yağı grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrofrafı. Çörek otu yağı grubunda seminifer epitel hücrelerinde orta düzeyde caspase-3 pozitif (ok) ve negatif (kıvrımlı ok) bölgeler. **Boyama:** Caspase-3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 40: Metformin grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrografı. Metformin grubunda seminifer epitel hücrelerinde orta düzeyde caspase-3 pozitif (ok) alanlar ve negatif ekspresyon alanları (kıvrımlı ok). **Boyama:** Caspase-3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



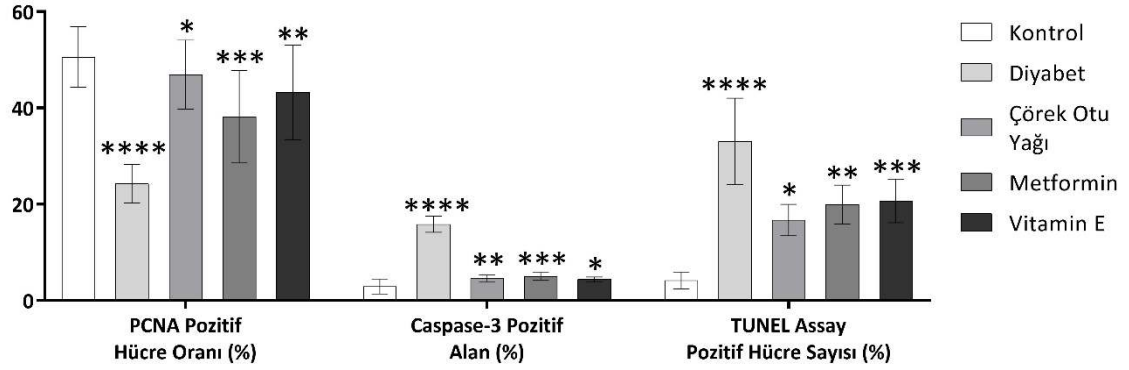
Resim- 41: Vitamin E grubu Caspase-3 immunohistokimya mikrografı. Vitamin E grubunda seminifer epitel hücrelerinde caspase-3 pozitif (ok) ve negatif olduğu alanlar (kıvrımlı ok). **Boyama:** Caspase-3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

5.4.3 TUNEL Assay Bulguları

TUNEL Assay ile DNA fragmentasyon ve Apoptotik İndeks (AI) analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu diğer gruplara oranla en düşük ortalama değere sahip olup diğer tüm gruplar ile arasında anlam bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Çörek otu yağı ile metformin grubu aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), ancak çörek otu yağı grubunun, metformin grubu dışındaki gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Metformin grubu ile vitamin E grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) ancak bu grubun kontrol ve diyabet grupları ile aralarında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Vitamin E grubunda ise metformin grubu dışında tüm gruplar ile aralarında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Ayrıca diyabet grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) sonucuna varıldı (Tablo-12, Resim: 42-46, Şekil-24).

Tablo- 12: Grupların TUNEL Assay istatistiksel analiz değerleri

	Kontrol	Diyabet	Çörek Otu Yağı	Metformin	Vitamin E	<i>p değeri</i>
TUNEL Assay	4,17 ± 1,73 ^a	33,06±8,95 ^d	16,73 ± 3,25 ^b	19,97±4,02 ^{bc}	20,70 ± 4,51 ^c	<0.05



Şekil- 24: Grupların immunohistokimya ve TUNEL Assay istatistiksel analiz sonuç grafikleri. **PCNA Pozitif Hücre Oranı:** Diyabet ve metformin gruplarıyla karşılaştırıldığında $*p<0.05$, kontrol, diyabet ve metformin gruplarıyla karşılaştırıldığında $**p<0.05$, tüm gruplarla ayrı ayrı karşılaştırıldığında $***p<0.05$ ve $****p<0.05$. **Caspase-3 Pozitif Alan:** Kontrol, diyabet ve metformin gruplarıyla karşılaştırıldığında $*p<0.05$, Vitamin E dışındaki tüm gruplarla ayrı ayrı karşılaştırıldığında $**p<0.05$, Çörek otu yağı dışındaki tüm gruplar ile karşılaştırıldığında $***p<0.05$, tüm gruplarla karşılaştırıldığında $****p<0.05$. **TUNEL Assay Pozitif Hücre Sayısı:** Kontrol, diyabet ve Vitamin E gruplarıyla karşılaştırıldığında $*p<0.05$. Kontrol ve diyabet gruplarıyla karşılaştırıldığında $**p<0.05$. Kontrol, diyabet ve çörek otu yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında $***p<0.05$. Tüm gruplarla karşılaştırıldığında $****p<0.05$.

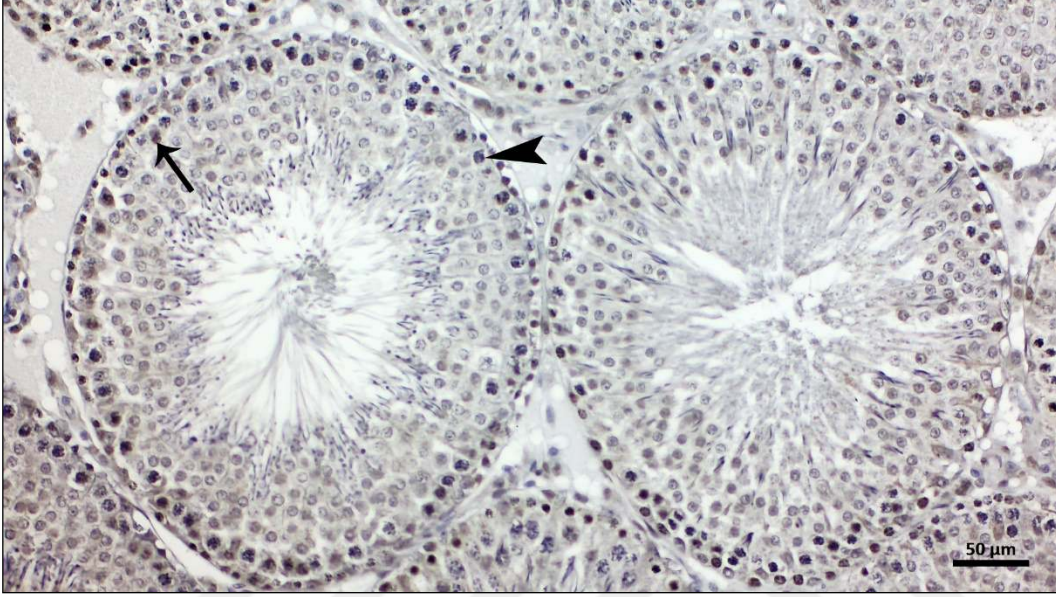
Kontrol grubu testis kesitlerinde bazı seminifer tubüllerde yer yer TUNEL pozitif hücrelerin olduğu tespit edildi. Aynı zamanda seminifer tubüllerin yapısının düzgün olduğu izlendi (Resim-42).

Diyabet grubu testis kesitlerini incelediğimizde seminifer tubül germ hücrelerinde yoğun TUNEL pozitif hücreleri izlendi. Ayrıca seminifer tubül yapısında bozulmalar tespit edildi (Resim-43).

Diyabet+çörek otu yağı grubu testis kesitlerinde seminifer tubüllerde TUNEL pozitif hücrelerin varlığı izlendi. Seminifer tubül yapısının düzgün olduğu ve kontrol grubuna göre pozitif hücre sayısının daha fazla olduğu izlendi (Resim-44).

Diyabet+metformin grubu testis kesitlerinde diyabet grubuna göre seminifer tubüllerde daha az TUNEL pozitif hücreler izlendi (Resim-45).

Diyabet+vitamin E grubu testis kesitlerinde diyabet grubuna göre seminifer tubüllerde daha az TUNEL pozitif hücreler izlendi (Resim-46).



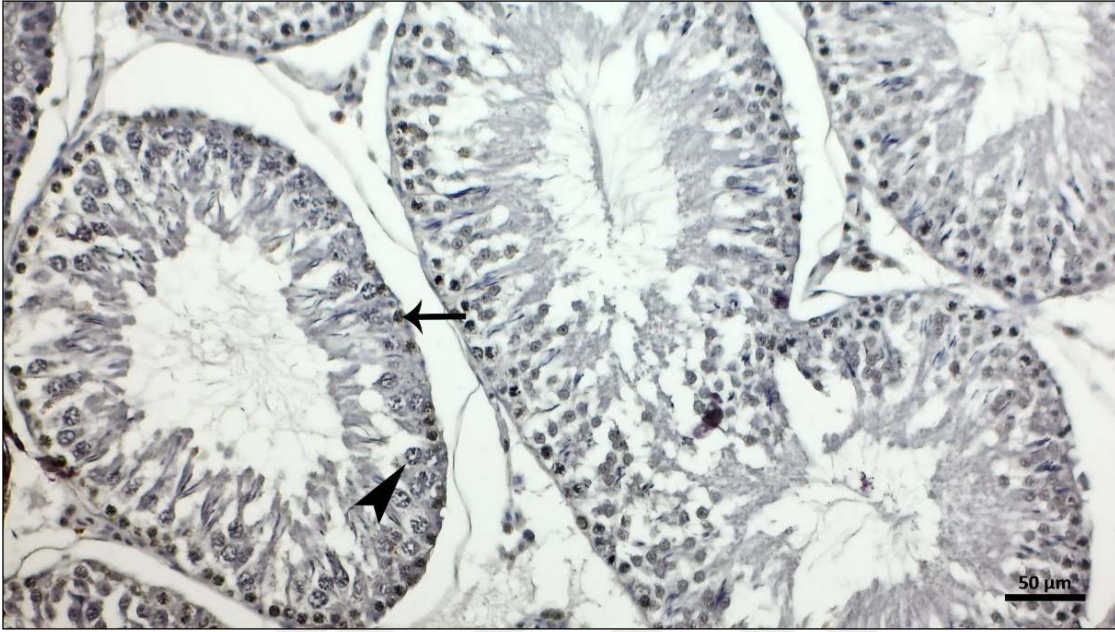
Resim- 42 :Kontrol grubu kesitlerinde TUNEL Assay. TUNEL pozitif (ok) ve negatif (ok başı) germinal epitel hücreleri. **Boyama:** TUNEL Assay. **Zıt Boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



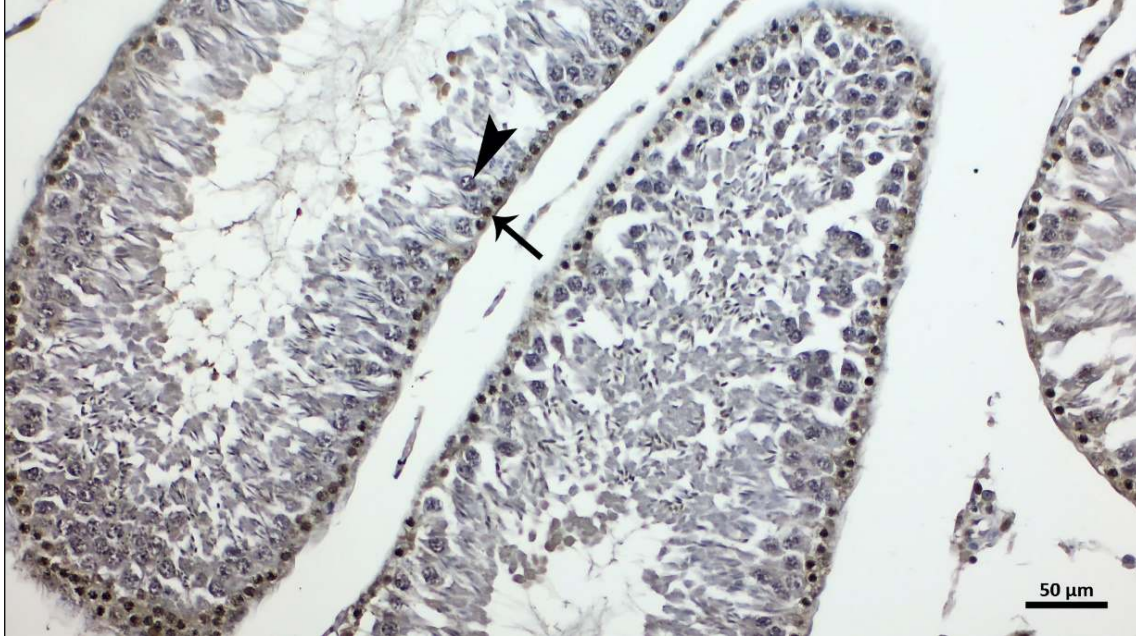
Resim- 43: Diyabet grubu kesitlerinde TUNEL Assay. TUNEL pozitif (ok) ve negatif (ok başı) germinal epitel hücreleri. **Boyama:** TUNEL Assay. **Zıt Boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 44: Çörekotu yağı grubu kesitlerinde TUNEL Assay. TUNEL pozitif (ok) ve negatif (ok başı) germinal epitel hücreleri. **Boyama:** TUNEL Assay. **Zıt Boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 45: Metformin grubu kesitlerinde TUNEL Assay. TUNEL pozitif (ok) ve negatif (ok başı) germinal epitel hücreleri. **Boyama:** TUNEL Assay. **Zıt Boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Resim- 46: Vitamin E grubu kesitlerinde TUNEL Assay. TUNEL pozitif (ok) ve negatif (ok başı) germinal epitel hücreleri. **Boyama:** TUNEL Assay. **Zıt Boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

6 TARTIŞMA

Diyabetes Mellitus; nefropati, retinopati ve üreme sistemi üzerinde ciddi komplikasyonlara yol açan kronik metabolik hastalıklardan biridir (241). Bazı araştırmacılar, diyabet sonucu oluşan komplikasyonları hafifletmek için antioksidan tedavi uygulamalarını incelemişlerdir (17,122,242). Çörek otu yağı ve vitamin E'nin antioksidan özelliklere sahip olduğu ve oksidatif strese karşı koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir (125,126,179). Ayrıca metformin, diyabette kullanılan bir bileşik olup diyabet ile ilişkili komplikasyonlara karşı koruyucu etkisi olabileceği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (132,138). Yaptığımız çalışmada diyabetik rat testisleri üzerinde çörek otu yağı, metformin ve vitamin E'nin koruyucu etkileri araştırıldı.

STZ ile diyabet oluşturulan erkek ratların vücut ağırlıklarının değerlendirildiği bir çalışmada; herhangi bir tedavi uygulanmayan diyabet grubunun kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlığında ciddi bir azalma olduğu belirtilmiştir (243). Bir başka çalışmada ise diyabet oluşturulan yetişkin erkek ratlarda metformin ile tedavi uygulanmış ve vücut ile testis ağırlıkları değerlendirmişlerdir. Çalışmada kontrol grubu, tedavi uygulanmayan diyabet grubu ve metformin tedavisi uygulanan diyabet grupları incelenmiştir. Tedavi uygulanmayan diyabetik gruptaki hayvanların vücut ağırlığı, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde ($P < 0.05$) azaldığı ve metformin tedavisi uygulanan diyabet grubunun vücut ağırlığının da kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Metformin ile tedavi edilen diyabetik ratların, tedavi edilmeyen diyabetik ratlara kıyasla daha fazla vücut ağırlığı kaybı gösterdiği, ancak vücut ağırlığındaki bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda testis ağırlıkları incelendiğinde ise kontrol grubu en büyük ağırlığa sahip olup, tedavi uygulanmayan diyabet grubu ve metformin tedavisi uygulanan diyabet grubu ile aralarında anlamlı fark olduğu belirtilmiştir. Metformin ile tedavi edilen diyabet grubu testis ağırlığında en düşük değere sahip olduğu ancak tedavi uygulanmayan diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (244). Kaplanoğlu ve ark. diyabete ilişkin yapmış oldukları bir çalışmada, diyabetik ratlar üzerinde vitamin E'nin etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada vücut ağırlığı ölçüm

sonuçlarına göre kontrol grubu ratlarına göre E vitamini ($p<0.001$) ile tedavi edilen diyabet grubunun vücut ağırlığında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (239).

Ghissi ve arkadaşları (130) alloksan ile diyabet oluşturdıkları çalışmada nigella sativa tohumlarının (çörek otu tohumları) etkisini incelemişlerdir. Diyabetik erkek sıçanların diyetinde 30 gün boyunca %2 dozda nigella sativa tohumlarının (çörek otu tohumları) oral yoldan verilmesiyle, epididim, prostat ve seminal vezikül ile vücut ağırlığı-testis ağırlığının artmasına, meni miktarı ve hareketliliğinin arttığı, kan şekeri seviyesinin düştüğü ve diyabetik gruba göre serum testosteron düzeyindeki artışa neden olduğunu kaydetmişlerdir. Bazı araştırmacılar (245) ise gonadal ağırlığın azalmasına genel vücut ağırlığı kaybının eşlik ettiğini kaydetmişlerdir. En fazla gonadal kilo kaybı, diğer gruplara göre metformin ile tedavi edilen grupta görülmüştür. Kontrol grubunda gonadal ağırlığın vücut ağırlığına oranı %1.8, metformin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda bu oran % 1.72 ve tedavi edilmemiş diyabetik sıçanlarda % 2.07 olduğunu kaydetmişlerdir (244). Çalışmamızda ise deney grupları arasında gonad /vücut ağırlığı oranının karşılaştırılması, diyabetik gruplarda gonad ağırlığının kaybının vücut ağırlığı değişikliklerine bağlı olabileceği gösterilmiştir. Tedavi edilmeyen diyabetik gruptaki bu oranın yükselmesi, testisin interstisyel bağ dokusunda amorf malzeme birikimine bağlı gibi görünüyordu. Bu nedenle, gonadal ağırlığın azalması, genel vücut ağırlığı kaybı ve / veya STZ'nin neden olduğu tedavi edilmemiş ve metformin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda epididimislerin ağırlığının azalması nedeniyle olabilir. Yapılan bazı çalışmalara göre, kontrol grubu ile tedavi uygulanmayan diyabet grubu; testis, epididimis, prostat ve seminal vezikül ağırlıklarına göre karşılaştırıldığında tedavi uygulanmayan diyabet grubu en düşük değere sahip olup kontrol grubu ile aralarında anlamlı farklılık göstermektedir (129,130,243,246,247).

Çalışmamızda testis, seminal vezikül, prostat ve epididimis ölçümlerinin istatistiksel analiz verilerine göre; testiste, kontrol grubu en yüksek değere sahiptir ve çörek otu yağı, vitamin E ve metformin ile tedavi edilen diyabet grupları ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığını ($p>0.05$) elde ettik. Ancak tedavi uygulanmayan diyabet grubu ile aralarında anlamlı bir fark ($p<0.05$) tespit ettik. Seminal vezikül ağırlığına göre kontrol grubu en yüksek değere sahiptir ve çörek otu yağı ile tedavi edilen grup değer olarak kontrole en

yakın gruptur. Metformin ve vitamin E ile tedavi edilen gruplar ile diyabet grubu arasında anlamlı bir farklılık olmadığını ($p>0.05$) sonucuna ulaştık. Prostat ağırlığı verilerine göre; kontrol grubu ve çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabet grubunun birbirine benzer değerlere sahip olduğu ve diğer gruplar ile aralarında anlamlı bir fark olduğunu ($p<0.05$) tespit ettik. Tedavi edilmeyen diyabet grubu en düşük değere sahip olup diğer 4 gruba aralarında anlamlı bir fark ($p<0.05$) olduğunu da gözlemledik.

Ayrıca Navarro ve arkadaşları (13) yaptıkları bir diyabet çalışmasında, tubul çaplarının azalmasıyla birlikte testis ağırlıklarının da azaldığı ancak zamanla belirgin bir hal almadığını ifade etmişlerdir. Bu konuda Jackson-Hutson (248) ile Ford-Hamilton (249) da diyabetik ratlar üzerinde çalışma yapmışlar ve Navarro ve ark'nın (13) bulgularıyla benzer görüşü ileri sürmüşlerdir, buna karşın Oksanen (250) zaman içinde testis ağırlığının belirgin azaldığını ifade etmiştir. Anderson ve Thliveris'nin (251) yaptıkları bir çalışmada ise kısa vadede testis ağırlığında bir artış (diyabetin başlamasından 1 ay sonra) meydana gelirken uzun vadede ise testis ağırlığında düşüş olduğunu (diyabetin başlamasından 6 ay sonra) kaydetmişlerdir. Çalışmamızda ise gruplar arasında epididimis ve testis ağırlığı ortalama değerinin diyabet grubunda en düşük olduğu bu grup ile çörek otu yağı, metformin ve vitamin E grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığını ($p>0.05$) tespit etmiş bulunuyoruz (Tablo-3, Şekil-17).

Deney öncesi vücut ağırlık ölçüm örnekleri istatistiksel olarak incelendiğinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığını ($p>0.05$) gözlemledik. Deney sonrası vücut ağırlıklarının istatistiksel sonuçlarında en yüksek ağırlık artışının kontrol grubunda olduğu ardından çörek otu grubunda da ağırlık artışının mevcut olduğu ve aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) saptadık. Metformin ve vitamin E gruplarının vücut ağırlıklarında ise düşüş meydana geldi fakat vücut ağırlığı değerleri kontrol ve diyabet grupları arasında yer almaktaydılar. Aynı zamanda istatistiksel olarak bu iki grup ile kontrol, çörek otu yağı ve diyabet grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) sonucu elde edildi. Diyabet grubu ise en düşük ağırlık oranına sahip olup kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildik.

Verilerimiz, STZ'nin neden olduğu diyabetik ratlarda E vitamini tedavisinin, vücut ağırlığı üzerinde etkisi olduğunu gösteren önceki çalışmalara tezat oluşturmaktadır (239,252). Ayrıca metformin ile tedavi edilen diyabet grubunda testis ağırlığının kontrol ve tedavi edilmeyen diyabet grubuna göre en düşük değerde olduğunu gösteren çalışmaya göre de tezatlık göstermektedir (244). Bizim verilerimize göre ağırlıklı olarak çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabet grubu kontrol grubuna daha yakın verilere sahipti (Tablo-2-3, Şekil-16-17).

Deneysel çalışmamızda streptozotosin diyabet indüksiyonu için kullanılmıştır ve tedavi uygulanmayan diyabet grubunda ortalama kan glukoz seviyesi, tedavi edilmeyen sağlıklı (kontrol) ve tedavi uygulanan diyabetik gruplardan daha yüksekti. Çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda kan şekeri düzeyleri, tedavi edilmemiş diyabetik sıçanlara göre önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.05$), bu sonuç önceki sonuçlara paralellik göstermektedir (253). Ayrıca çörek otu yağı grubunun kan şekeri düzeyinin diyabet, metformin ve vitamin E grupları arasında anlamlı bir fark bulunduğunu ($p<0.05$) da vurgulamak isteriz. Metformin, vitamin E ve diyabet grupları arasında ise anlamlı bir fark olmadığını ($p>0.05$) tespit edildi. Metforminin STZ ile oluşturulan diyabetik ratların kan şekerini önemli ölçüde düşürdüğünü belirten çalışmalar ile verilerimiz tezatlık göstermektedir (244).

STZ, pankreas β hücrelerine etki ederek yetersiz insülin üretiminin gelişmesine yol açar ve sonuç olarak kan şekeri seviyesinde yükselme meydana getirmektedir. İnsülin direncinin, diyabetin gelişiminde en önemli faktör olduğu bilinmektedir (136) ve çalışma sonuçlarımıza göre, çörek otu yağının hedef hücrelerin insülin direncini azaltması üzerinde etkili olabilir.

DM'nin apoptotik hücre ölümü, testiste fonksiyon bozukluğu, seminifer tubüllerde atrofi, tubül çaplarında azalma ve spermatogenetik hücre serilerinin azalmasına neden olduğu iyi bilinmektedir. Seminifer tubül atrofisi ve spermatojenik hücrelerdeki azalma, spermatogenez yetmezliğinin morfolojik göstergeleridir (3,254,255). Çalışmamızda, gruplar arasında Johnsen biyopsi skor ortalama değerinin tedavi uygulanmayan diyabet grubunda en düşük olduğu, bu durum da testis hasarının varlığına işaret etmektedir (256). Ayrıca çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabet grubu ile kontrol grubu birbirine yakın

değerlere sahiptir. Metformin ve vitamin E ile tedavi edilen gruplar ise birbirlerine yakın değerlere sahip olup aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ve kontrol grubu ile tedavi uygulanmayan diyabet grubu arasında değer almışlardır. Bu konudaki sonuçlarımız önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur (239,256).

Bazı deneysel çalışmalarda (257,258), diyabetik hayvanların tubüllerinde pakiten spermatositlerde deskuamasyon ve incelme ile germinal epitelden erken spermatid oluşumu görüldüğünü, ayrıca seminifer tubül çapının önemli ölçüde azaldığı ve testiküler kan damarı sayılarının arttığı gözlemlemiştir. Altay ve ark (259), 5 gün süreyle 40 mg / kg IP streptozotosin enjeksiyonundan altı hafta sonra, diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre hem testis hem de seminifer tubül ortalama çaplarının anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca Hassan ve Moneium (260), STZ 'nin neden olduğu diyabette, seminifer epitelde germ hücrelerinin tükenmesine, spermatidlerin yanlış oryantasyonuna ve tubüler duvarların kalınlaşmasına neden olabileceği gibi seminifer tubüler çapında %18 azalma ve tubüler lumende %28 artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Deneysel çalışmamızda seminifer tubül çapı analizimize göre; en yüksek değere kontrol grubu sahip olup çörek otu yağı ile tedavi edilen grup ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı ancak diğer 3 grup ile arasında anlamlı fark olduğunu sonucuna varıldı. Metformin ve vitamin E ile tedavi uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı ve çörek otu yağı ile tedavi edilen grup ile diyabet grubu arasında bir değer aldıklarını gözlemledik. Bulgularımız önceki çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Başka bir çalışmada, Kianifard ve ark. (244) tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlarda testis kapsül çapında, seminifer tubüllerde ve germinal epitel yüksekliğinde azalma, interstisyel dokuda amorf materyalde artış, germ hücre tükenmesi, hücresel popülasyonda azalma ve spermatogenez aktivitesinde azalma ile bozulmanın şekillendiğini ifade etmişlerdir. Aksine yapmış olduğumuz çalışmanın deney gruplarında, tunika albuginea ve germinal epitel kalınlıkları bulgularında gruplar arasında istatistiksel yönden herhangi bir fark bulunmadığını gözlemledik ($p>0.05$).

Koh (112) yaptığı bir çalışmada, artan apoptotik hücre ölümü ve dejeneratif germ hücreleri ile epididim ağırlığında önemli bir azalma olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, histolojik kesitlerde görülen tubüler atrofi, çalışmadaki diyabetik sıçanlarda ilk dikkat çekici bulgu olmuştur. Diğer bazı araştırmacılar (3,257,261,262) STZ ile yaptıkları çok sayıda deneysel diyabet çalışmasında, deneklerin testislerinde tubüler atrofi gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda rastladığımız çok sayıda tubuler atrofi ve seminifer tubül çaplarındaki düşüş bu çalışmaların sonuçlarına paralellik göstermektedir. Seminifer tubüllere yerleşen Sertoli hücreleri ve spermatojenik seri hücrelerin beslenmesi, kan damarlarındaki interstisyel bağ dokusundan difüzyon yoluyla gerçekleşmektedir. Bu kan damarları sadece Leydig hücrelerinin beslenmesi için değil, aynı zamanda tubüllerin beslenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. İnterstisyel kan damarlarının kalınlaşması tubüler beslenmeyi azaltarak tubüler atrofiye yol açabileceği bildirilmiştir (254). Başka bir sonuç tubüler bazal membranda görülen kalınlaşmadır. Benzer şekilde Cameron ve arkadaşları (254) diyabetli bireylerde, diyabet nedeniyle seminifer tubüllerin bazal zarının kalınlaştığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda STBM kalınlığı kontrol grubu dışında kalan deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kan damarı duvarlarının kalınlaşması nedeniyle zaten bozulmuş olan tubül beslemesinin, tubülün bazal zarının kalınlaşması nedeniyle daha da kötüleşeceğini ve spermatogenezi olumsuz yönde etkileyeceği bilinmektedir. Ayrıca STBM'nin kalınlığı spermatogenezde önemli bir rol oynar. Diyabet, STBM'nin (263,264) kalınlaşmasını artırır ve bu kalınlığa, azalan sperm üretimi oranı ve seminifer tubüllerin boyutunda genel bir azalma eşlik eder. Çalışmamızın ışık mikroskopik bulguları, diyabetik sıçan testislerinde STBM kalınlığının arttığını, ancak çörek otu yağının bu kalınlık artışında azaltıcı bir etki ortaya koyduğu görüldü.

Yapılan deneysel diyabet çalışmalarında, seminifer tubüllerde dejenerasyon, nekroz, dev hücre oluşumu, interstisyel değişiklikler, seminifer tubül çapında azalma, apoptoz insidansında artış ve testis ağırlıklarında azalma olduğunu bildiren pek çok çalışma mevcuttur (3,11,12,265,257). Ghilissi ve arkadaşları (130) yapmış oldukları çalışmada, kontrol, diyabet ve diyabet+çörek otu gruplarında spermatolojik analizler yapmışlardır. Bu analiz sonucunda konsantrasyon ve motilite bulgularında; diyabet+çörek otu grubunun

kontrol grubuna daha yakın bulgulara sahip olduğunu ve iyileşme gösterdiğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, diyabetik erkek farelerin sperm parametreleri üzerinde vitamin E'nin sperm etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada kontrol, diyabet (herhangi bir tedavi uygulanmayan) ve vitamin E ile tedavi edilen diyabet grupların bulguları karşılaştırılmış olup; vitamin E+diyabet grubu bulgularının kontrol grubuna yakın sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Bu bulgulara dayanarak vitamin E'nin, sperm ve testis parametrelerini diyabetin istenmeyen etkilerine karşı korumak için uygun bir ajan olabileceği belirtilmiştir (266). Bir başka çalışmada metforminin, diyabetik erkek ratların sperm parametreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda metforminin diyabetin neden olduğu sperm parametreleri üzerindeki komplikasyonlara karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (267). Yaptığımız çalışmanın motilite ve konsantrasyon bulgularında daha önceki çalışmalar ile benzer sonuçlar elde edildi. Bu çalışmada, epididim kanallarında sperma yoğunluğu açısından diyabetik ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olduğu ($P<0.05$) ve diyabette kanallardaki sperma miktarının önemli ölçüde azaldığı, motilite ortalama değerinin en düşük diyabet grubunda olduğu ve bu grubun geri kalan tüm gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) belirlendi (Şekil-22) ve bunun seminifer tubüllerin dejenerasyonuna bağlı olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca konsantrasyon verilerimizde çörek otu yağı ile tedavi edilen grubun diğer 4 gruba göre en yüksek değere sahiptir. Deneysel çalışmamızın epididimal sperm baş, boyun, kuyruk ve toplam defekt sonuçlarında; kontrol, diyabet+çörek otu yağı, diyabet+vitamin E ve diyabet+metformin grupları ile diyabet grubunu karşılaştırdığımızda aralarında anlamlı bir fark bulunduğunu tespit ettik. Yapılan bir çalışmada, metforminin diyabetik erkek ratların sperm baş ve kuyruk defekti üzerine etkisi araştırılmıştır ve bizim bulgularımız ile uyumlu benzer sonuçlar rapor edilmiştir (267).

DM, oksidatif strese, yani kronik hipergliseminin varlığına bağlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasına yol açar (268,269). Hipergliseminin diyabetik hastaların hedef organlarındaki ayrıca, oksidatif stresin diyabetik testis yapısı üzerine belirgin etkileri fonksiyonel ve histolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (270). Çalışmamızda,

diyabetik grupta çörek otu yağı histolojik bulguları, spermatojenik hücreleri normalleştirdiği gibi testisi de korumuştur.

Diyabetik koşullarda anormal spermatogenez çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (254,255). Bu çalışmalarda, tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlarda spermatogenezin, kontrol ve metformin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlara kıyasla bozulduğunu ortaya koymuştur. Önceki çalışmalarda seminifer tubüllerin (ST) çapının azaldığı bildirilmiştir (3,260). Tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlarda, ST'lerin çapındaki azalmaya germinal epitelyum yüksekliğinde azalma eşlik etmiştir; bu bulgu, ST'lerin diyabet sırasında köreldiğini göstermektedir. ST'lerde yapılan bu histolojik gözlemler, spermatojenik hücrelerin depresif hücresel aktivitesini göstermektedir. Çalışmada diyabetik testislerde spermatogonia hücre sayısı azaldığını, ancak bu azalma anlamlı olmadığını vurgulamışlardır. Tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlarda, primer spermatosit sayısı, kontrol ve metformin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlara kıyasla önemli ölçüde azaldığı ifade edilmiştir. Bu bulgu, spermatogonianın primer spermatositlere dönüşümünün diyabetik koşullarda azaldığını göstermektedir. Diyabetik sıçanlarda azalan tubüler farklılaşma ve spermiyasyon indeksleri seminifer tubüllerin hücresel aktivitelerindeki bu değişikliği doğrulamaktadır. Tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlarda repopülasyon indeksinin azalması, diyabetin indüklenmesinden sonra inaktif spermatogonia sayısının arttığını ve sonuç olarak, spermatogonia hücrelerinden türetilen primer spermatosit sayısının azaldığını göstermektedir. Hücresel dönüşüm ve/veya aktivitedeki bu değişiklikler spermatozoid üretiminde azalmaya yol açar. Önceki bazı çalışmalar, diyabetik sıçanların testis dokusunda interstisyel alandaki artışı rapor etmişlerdir (244,260). Bu çalışmaya paralel olarak biz de çalışmamızda, diyabetik sıçan testislerinde interstisyel bağ dokusu ve amorf materyaldeki artış gözlemledik. İnterstisyel bağ dokusunun bu artışı diyabetik koşullarda mikrovasküler anjiyopati ile ilişkilidir (11). Testis dokusunun histolojik değişiklik sonuçlarımız benzer bulundu. ST'lerin dejenerasyonu ve nekrozu, dev hücre oluşumu ve interstisyel değişiklikleri bildiren önceki çalışmalarla uyumluydu (257,271). Çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda, tüm histolojik gözlemler tedavi edilmemiş diyabetik sıçanlara kıyasla daha iyi görünüyordu. Bu bulgular, çörek otu yağının, yüksek

kan şekeri seviyelerinin düşürülmesi ile diyabetin üreme sisteminin işlevi ve yapısı üzerindeki yan etkilerini azaltabildiğini göstermektedir.

Ayrıca tubüler çaplardaki azalma, birkaç deneyle Anderson ve Thliveris (251,272) tarafından gösterilmiştir. Bu azalmaya genellikle boş testiküler tubül sayısında ve vasküler yoğunlukta bir artış eşlik ettiğini bu durumun bizim bulgularımızla tezat oluşturduğunu düşünmekteyiz. Sampannang ve arkadaşları (273) yaptıkları bir deneysel çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, seminifer tubüllerde, interstisyel dokuda histolojik değişiklikler ile seminifer tubül çapı ve seminifer epitel yüksekliği gibi morfometrik göstergeleri kaydetmişlerdir. STZ'nin diyabetik sıçanlarda histopatolojik ve morfometrik değişikliklere neden olduğuna dair pek çok çalışma mevcuttur (243,244,254,256,258,260,274–277). Tarleton ve ark (277) diyabetik hayvanlarda, testiküler histolojik değişikliklerin: matürasyon bozukluğu, spermatidlerin yanlış oryantasyonu ve hipospermatogenez dahil olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca Ricci ve ark (243) STZ'nin neden olduğu diyabetin anormal histolojik seminifer epitel hücre yapısı, spermatogenez ve plazma testosteron seviyelerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Deneysel çalışmamızda, seminifer tubüllerin dejenerasyonu açısından diyabetik ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğunu (Şekil-18) sonucunu gözlemledik ($p < 0.05$). Diğer bulgulardaki istatistiksel fark anlamlı olmamasına rağmen, diyabetik grupta tubül anormallliği, dev hücre oluşumu (Resim-15) ve interstisyel hücre infiltrasyonu kontrol grubuna kıyasla daha belirgindi. Şiddetli dejenerasyon gösteren testislerde, sadece Sertoli hücreleri (Resim-16) ve seminifer tubül bazal membran bütünlüğünü koruyordu.

Diyabet, kandaki glikoz seviyelerinin çok yüksek olduğu kronik bir hastalıktır. DM'nin erkek üreme sistemi üzerinde büyük ölçekte olumsuz etkileri olduğu yapılan çok sayıda çalışmada izlenmiştir. Bu bağlamda Bondarenko ve arkadaşları (278) STZ kullanarak diyabet oluşturdukları sıçanların testislerinde, germinal epitel tabakasının tubüler bazal membrandan ayrılması ve damarlarda tromboz varlığı gibi testislerde nispeten daha hafif dejeneratif değişiklikler olduğunu tespit etmişlerdir. Diyabetik sıçan testislerinde STZ ile yapılan histomorfolojik çalışmalarda, aynı konuda daha ayrıntılı bir çalışma yürüten

Kianifard ve arkadaşları (244), germinal epitel yüksekliğinde ve seminifer tubül çapında büzülmeyi, interstisyel dokuda ödem, germ hücrelerinin kaybı ile birlikte spermatogenezin bozulmasını belirlemişlerdir (279). Benzer şekilde, yapılan ışık mikroskopik çalışmada, histolojik kesitlerde germ hücre kaybıyla birlikte spermatogeneziste bozulma ve interstisyel dokuda ödem kaydedilmiştir. Öztürk ve ark. (12) aynı tip diyabetik sıçanların testislerinin histolojik incelemesi sonucunda tubüler atrofi gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada seminifer tubüllerde, Sertoli hücrelerinde ve spermatogenetik seri hücrelerde farklı derecelerde kayıp bildirilmiştir. Testosteron düzeylerinde azalma diyabette testiküler atrofiyi açıklamaktadır. DM, insülinin sperm hücreleri ve testisleri üzerindeki doğrudan etkisi ile erkeklerde üreme sistemine zarar verir veya hipotalamik-pituitergonadal ekseninde değişiklikler yaptığı belirtilmiştir (280).

Diğer bir bulgu, seminifer tubüllerde çok çekirdekli dev hücrelerin görülmesidir. Benzer şekilde pek çok araştırmacı (281–285) bazı seminifer tubüllerde çok çekirdekli dev hücreler gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda, bu hücreler tubüler atrofiye neden olan sistemik, toksik, enfeksiyöz, iskemik patolojilerde ve kriptorşidizmde görülmüştür. Bu çalışmalara paralel olarak biz de çalışmamızda çok çekirdekli dev hücreler gözlemledik (Resim-15). Önceki çalışmalarda, bu dev hücrelerin çekirdek kromatinleri, hilal benzeri bir görünümde çekirdek zarın iç tarafına yerleşik olduğu izlenmiştir (281,284). Bu görünüm apoptotik hücrelerde izlenen kromatin yapısı ile eşleşir (286). Bir diğer önemli bulgu ise Leydig hücrelerindeki sayı azalması dışında histolojik bir değişiklik olmamasıdır. Bu bulgu Joan ve arkadaşları (7) tarafından diyabetin doğurganlığı ve cinsel isteğin azalması şeklinde yorumlanmıştır. Leydig hücre fonksiyonu ve testosteron üretimindeki azalmanın nedeninin, insülinin bu hücreler üzerindeki uyarıcı etkisinin azalması olduğuna inanılmaktadır. İnsülinin azalması nedeniyle FSH'deki azalma hem sperm üretimini hem de doğurganlığı olumsuz yönde etkilemektedir (7). Keza Öztürk ve arkadaşları (12) Leydig hücrelerinde değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra diyabetik sıçanların testislerinde atrofik seminifer tubüllerde, interstisyel doku kılcal damarlarında ve arteriyollerde membran kalınlaşması sonucu spermatojenik seri hücreleri kaybına işaret etmişlerdir. Bununla birlikte, tubüllerde çok çekirdekli dev hücreleri, Sertoli hücrelerinde

vakuollerin, interstisyel bağ dokusunda iltihabi hücre infiltrasyonunun ve atrofinin geliştiğini not etmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sıçan testislerinde spermatogenetik seri hücre ölümünün spontan ve gonadotropik hormon yetersizliği ve ısı artışına bağlı apoptoz olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (287). STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlara dışarıdan insülin verildiğinde testosteron düzeylerinde artış olmuştur (272). Görüldüğü gibi STZ ile diyabetin indüklendiği sıçan modellerinde testis dokularının histomorfolojik incelemelerinin bulgusu olarak aynı sonuçlar bildirilmesine rağmen, çok sayıda çalışmada hormonal ölçümler yer almıştır. Bu ölçümlerin bir sonucu olarak, insülin replasman tedavisi ile hem hormonal hem de hücresel değişikliklerin iyileşip iyileşmediğini incelemişlerdir.

Kaplanoğlu ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, STZ kaynaklı diyabetik ratların testis dokusu üzerinde yeşil çay ve vitamin-E'nin etkisini araştırmışlardır. Testis dokusu immunohistokimya analizinde proliferatif indeks için PCNA antikoru kullanmışlardır. PCNA immunohistokimya bulgularına göre, herhangi bir tedavi uygulanmayan diyabet grubunun pozitif hücre oranının, vitamin E ile tedavi edilen diyabetik gruba göre düşük olduğunu ve diyabetik ratların testislerinde proliferasyonun zayıf olduğunu bildirmişlerdir (239). Bir başka çalışmada, diyabete bağlı testiküler oksidatif stres, inflamasyon ve kaspaz bağımlı apoptoz üzerinde metforminin koruyucu etkisi araştırılmıştır (288). Metformin ile tedavi edilen diyabetik ratların, herhangi bir tedavi uygulanmayan diyabet gruba oranla PCNA immuno-ekspresyonunda önemli artış olduğunu ve tedavi edilmeyen diyabetik ratların testislerinde germ hücresi apoptozunun arttığını ve proliferasyonun zayıf olduğunu rapor etmişlerdir. (239,288). Ayrıca araştırmacılar yaptıkları çalışmada metforminin diyabet üzerinde oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz üzerinde dolaylı bir düzenleyici etkisi olabileceğini belirtmiştir (288). Bizim çalışmamızın PCNA analiz sonuçlarına göre; Kontrol grubu ile diyabet+çörek otu yağı grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), buna karşın diyabet grubu ile diyabet+metformin ve diyabet+vitamin E grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğunu ($p<0.05$) saptadık. Verilerimize göre PCNA pozitif hücre oranı tedavi edilen diyabet grupları arasında çörek otu yağı ile tedavi edilen diyabet grubunda en yüksek değere sahiptir.

Diyabete ilişkin yapılan bir çalışmada (271), tedavi edilmeyen diyabetik grupta, düzensiz seminifer tubüllerin olduğu, ayrıca apoptotik spermatojenik hücrelerin tubüler lumene dökülmesiyle germ hücre katmanlarında azalma gösterdiğini vurgulamışlardır. Diğer bazı araştırmacılar (289) ise, spermatojenik hücrelerin germinal epitelde apoptoza ve tubüllerin atrofisine neden olduğu için testiküler dokunun diyabetik hastalığın hedefi olduğunu bildirmişlerdir. Diyabetik tedavi edilmemiş gruptaki ortalama Caspase-3 pozitif hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu bu çalışmamız ile (Tablo-11, Resim-38) benzer sonuçlar vermiştir. Çörek otu ile tedavi edilen diyabet grubunda caspase-3 pozitif hücre sayısı, tedavi uygulanmayan diyabet grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı. Metformin ile tedavi edilen grupta ise, az sayıda tubül Caspase-3 pozitif reaksiyonu gösterdi. Ayrıca, Caspase-3 pozitif hücrelerin ortalama sayısı, diyabetik gruba kıyasla önemli ölçüde azalmıştı. Vitamin E ile tedavi edilen diyabetik grubun spermatojenik tubül yapısını geliştirdiğini ve ortalama Caspase-3 pozitif hücre sayısını azalttığını göstermektedir.

Nna ve arkadaşları (266) Sprague–Dawley cinsi 18 adet ratı; kontrol, diyabet ve metformin ile tedavi edilen diyabet grubu olarak eşit 3 grup üzerinde çalışma yapmışlardır. Diyabetin testisteki apoptozisini ve bu durum üzerinde metforminin koruyucu rolünü araştırmışlardır. Çalışmanın TUNEL Assay analiz sonuçlarına göre, tedavi edilmeyen diyabetik rat gruplarında pozitif hücre sayısı artmış olduğunu ve bu durumun apoptozis vurgusu yaptığını bildirmişlerdir. TUNEL Assay pozitif hücre sayısı diyabet+metformin grubunda diyabet grubuna göre azalma gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda yapılan başka bir çalışmada vitamin E ile tedavi edilen diyabet grubu TUNEL Assay pozitif hücre sayısının, tedavi uygulanmayan diyabet grubuna göre azalma gösterdiği rapor edilmiştir (239). Deneysel çalışmamızın TUNEL Assay istatistiksel analizine göre; kontrol grubunun diğer deney gruplarına oranla en düşük değere sahip olduğu, buna karşın diğer tüm gruplar ile arasında anlamlı bir fark olduğunu ($p<0.05$) ayrıca diyabet+çörek otu yağı, diyabet+metformin ve diyabet+vitamin E grupları ile diyabet grubu arasında da anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu bulgulara dayanarak diyabetten kaynaklanan apoptozis üzerinde çörek otu yağı, metformin ve vitamin E'nin azaltıcı olduğunu düşünmekle birlikte çörek

otu yağı ile tedavi edilen diyabet grubunun metformin ve vitamin E ile tedavi edilen diyabet grubuna kıyasla en düşük pozitif hücre sayısına sahip olduğunu belirtmek isteriz.

Pek çok çalışmada metformin ile vitamin E kombine şekilde kullanılmıştır. Vitamin E'nin tek başına testisin diyabetik komplikasyondan karşı korunmada yetersiz olduğunu, ancak etkili olması için metformin ile kombine tedavi olarak kullanılması gerektiği gösterilmektedir (265). Kombinasyon tedavisinin arttırılması, diyabetik sıçanlarda bozulmuş redoks durumunun kontrolüne yol açan ve mücadele eden vitamin E'nin antioksidan ve hipolipidemik aktivitelerine ek olarak, glisemik durumdaki iyileşmede metformin ve vitamin E arasında sinerjistik bir etkiye yol açabilir.

Diyabetik sıçanlarda erkek üreme fonksiyonundaki iyileşme, çörek otu yağının koruyucu etkisinden kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Bulgularımız, Al- Sa'aidi (245) ve Mohammad ve ark., (129) çörek otu tohumunun yetişkin erkek sıçanda doğurganlık ve üreme sistemi üzerinde artış etkisi yarattığını ortaya koydukları çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Erkek sıçanların üreme fonksiyonlarının çörek otu tohumu tarafından iyileştirilmesi, muhtemelen protein bileşenleri, A, B ve C gibi vitaminler, ayrıca üreme organlarının ağırlığını artıran çinko, bakır ve magnezyum gibi önemli minerallerin varlığı (290-292) ve çörek otu tohumlarının testosteron salgılanmasını uyaran alkaloidler ve fenoller içermesi ilgili olabileceği belirtilmiştir (293).

7 SONUÇ

Yaptığımız deneysel çalışma sonucunda streptozotosin ile oluşturulan diyabetin, testis dokusunda hasar meydana getirdiği gösterilmiştir. Histolojik, morfolometrik, epididimal spermatolojik analiz, immunohistokimyasal ve TUNEL Assay değerlendirmelerinde; diyabetin testis dokusunda, epididimal sperm parametrelerinde, seminifer tubüller ve interstisyel alanda hasar şekillendirdiği ve spermatogenetik seri hücrelerinde yoğun apoptozise yol açtığını gözlemledik.

Diyabet tedavisinde kullanılan bir kimyasal olan metformin ve antioksidan özellikleri bilinen vitamin E ve çörek otu yağının diyabetin yol açtığı infertilite, testiküler ve spermatolojik hasar üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde; metformin ve vitamin-E'nin kullanılmasının, özellikle üreme sisteminde diyabetik komplikasyonların tedavisinde çoğunlukla daha az etkili olduğu, buna karşın çörek otu yağının çoğunlukla daha etkili olduğu düşünmekteyiz. Bu nedenle, çörek otu yağının, diyabetik hastalarda üreme bozukluğunda koruyucu tedaviyi desteklemek ve kan şekeri düzeyini düşürmek amacıyla diyetle birlikte terapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Diyabet ile ilgili etki mekanizması, sinyal yolları araştırılarak moleküler düzeyde ileri ek çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

8 KAYNAKLAR

1. Jangir R, Jain G. Diabetes Mellitus Induced Impairment of Male Reproductive Functions: A Review. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(3):147–57.
2. McDonald MW, Murray MR, Grise KN, Dylan Olver T, Dey A, Kevin Shoemaker J, et al. The glucoregulatory response to high-intensity aerobic exercise following training in rats with insulin-treated type 1 diabetes mellitus. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016;41(6):631–9.
3. 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(5):342–7.
4. Orth JM, Murray FT, Bardin CW. Ultrastructural changes in Leydig cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec.* 1979;195(3):415–28.
5. Kühn-Velten N, Waldenburger D, Staib W. Evaluation of steroid biosynthetic lesions in isolated Leydig cells from the testes of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* 1982;23(6):529–33.
6. Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Hiriart M, Larrieta ME, Vital P, Cerbón MA. Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *J Endocrinol.* 2005;187(2):217–24.
7. Ballester J, Muñoz MC, Domínguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl.* 2004;25(5):706–19.
8. Cameron DF, Orth J, Murray FT. Morphological alteration in the testes from diabetic man and rat. *Diabetes.* 1982; 31:11-15.
9. Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;214; 1–11.

10. Ozdemir O, Akalın PP, Baspınar N, Hatipoglu F. Pathological changes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bull Vet Institute Pulawy*. 2009;53(4):783–90.
11. Sanguinetti RE, Ogawa K, Kurohmaru M, Hayashi Y. Ultrastructural Changes in Mouse Leydig Cells after Streptozotocin Administration. *Exp Anim*. 1995;44(1):71–3.
12. Ozturk F, Gul M, Agkadir M, et al. Deneysel Diyabetin Sıçan Testislerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. *T Kin J Med Sci*. 2002; 22:173-178.
13. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Chafer-Rudilla M, de Onzono LI, Blazquez-Cabrera JA, Miralles-Garcia JM. Effect of Experimental Diabetes and STZ on Male Fertility Capacity. Study in Rats. *J Androl*. 2010;31(6):584–92.
14. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;93(1):56–62.
15. Je HD, Shin CY, Park HS, Huh IH, Sohn UD. The comparison of vitamin C and vitamin E on the protein oxidation of diabetic rats. *J Auton Pharmacol*. 2001; 21(5):231–6.
16. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA, Sirajudeen KNS, Salleh MSM, Gurtu S. Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biol Sci*. 2011;7(2):244–52.
17. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Honey: A novel antioxidant. *Molecules*. 2012;17(4):4400–23.
18. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*. 2005; 26(6):654–60.

19. Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem.* 2002;50(21):5870–7.
20. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS, Sirajudenn KNS. Hepatoprotective effect of tualang honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Appl Res Nat Prod.* 2012;4(4):37–41.
21. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh MSM, Gurtu S. Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Endocrinol (Paris).* 2010;71(4):291–6.
22. Mohamed M, Sulaiman SA, Jaafar H, Salam KN. Antioxidant protective effect of honey in cigarette smoke-induced testicular damage in rats. *Int J Mol Sci.* 2011;12(9):5508–21.
23. Wu MS, Johnston P, Sheu WHH, Hollenbeck CB, Jeng CY, Goldfine ID, et al. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care.* 1990;13(1):1–8.
24. Moll E, Van der veen F, Van wely M. The role of metformin in polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Hum Reprod Update.* 2007;13(6):527–37.
25. Tartarin P, Moison D, Guibert E, Dupont J, Habert R, Rouiller-Fabre V, et al. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod.* 2012;27(11):3304–14.
26. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(13–14):1749–70.
27. Chakravarty HL. *Plant Wealth of Iraq (A Dictionary of Economic Plants).* Ministry of Agriculture and Agrarian Reform. 1976;505.

28. Enari M, Sakahire H. Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptozis and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998;391:43-50.
29. Standring S. *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice. Male reproductive system*, ed. M. Goldstein and A. Mehta. 2015: Elsevier Health Sciences. 1272 - 1287.
30. Marieb EN, Wilhelm PB, Mallatt J. *Human Anatomy. The reproductive system*. 8th edition. 2008;780.
31. Bingöl-Koloğlu M, Sara Y, Tanyel FC, Onur R, Büyükpamukçu N, Hişönmez A. Contractility and electrophysiological parameters of cremaster muscles of boys with a hernia or undescended testis. *J Pediatr Surg*. 1998; 33(10):1490–4.
32. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi. 1. Cilt, 4. Baskı*, Ankara: Güneş Kitabevi, 2006.
33. Moore K, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* Çeviren: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H. *İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri*, Ankara; 2002, s:323-333.
34. Sadler TW. *Langman's Essential Medical Embryology. Langmans Essent Med Embryol*. 2012;384.
35. Ross HM, Pawlina JL. *Histology a text and atlas*. Çeviren: Baykal B. *Histoloji konu Anlatımı ve Atlas*. 6. Basım. Palme Yayıncılık, İstanbul; 2014, s.603-625.
36. Dudek ER. *BRS Embryology. sixth edition*. Philadelphia; 2014;181.
37. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbı Fizyoloji*. Çeviren: Çavuşoğlu H. *Nobel Tıp Kitabevi*. 2011;916-927.
38. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Çeviren: Özgünen T, *Vander insan fizyolojisi*, Güneş Kitabevleri, 13. baskı, . 603-622.

39. William KO, Patrick CN. Çeviren: Müftüoğlu S, Kaymaz S, Atilla P. Netter Temel Histoloji Saunders Elsevier, Güneş Kitabevleri. 2009: 377-99.
40. Countouris N, Holstein AF. [How many testicular lobules does a human testicle contain? Reexamination of an old problem]. *Andrologia*. 1985;17(6):525–31.
41. Blue Histology-Male Reproductive System. Available from: lab.anhb.uwa.edu.au cited:2021 Jan 21.
42. Anthony L. Junquera's Basic Histology. Çeviren: Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS. Junquera's Temel histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015, s.407-422.
43. Haspolat K, Nergiz Y. Çocuk ve Ergenlerde Gonad Hastalıkları, (Bölüm Adı: Testis Histolojisi), sayfa: 25-34, Orient yayınları, 2019. Ankara.
44. Foley GL. Overview of Male Reproductive Pathology. *Toxicol Pathol*. 2001;29(1):49–63.
45. Rodriguez-Sosa JR, Dobrinski I. Recent developments in testis tissue xenografting. *Reproduction*. 2009; 138: 187–94.
46. Hadley MA, Byers SW, Suárez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M. Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol*. 1985;101(4):1511–1522.
47. Clulow J, Jones RC. Composition of luminal fluid secreted by the seminiferous tubules and after reabsorption by the extratesticular ducts of the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Biol Reprod*. 2004;71(5):1508–16.
48. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:149–79.

49. Oliveira PF, Alves MG. Sertoli cell metabolism and spermatogenesis. 2015: 3–13 Springer.
50. Kubota H, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. Vol. 99, *Biology of Reproduction*. Oxford University Press; 2018;99:52–74.
51. Eroschenko VP. *Difiore Histoloji Atlası*, Palme Yayıncılık, 2013.
52. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: Questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update*. 2006;12(3):275–82.
53. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. In: *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer Berlin Heidelberg; 2010;11–59.
54. Sprando RL, Russell LD. Spermiogenesis in the bluegill (*Lepomis macrochirus*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J Morphol*. 1988;198(2):165–77.
55. Kierszenbaum. *Histology and Cell Biology an Introduction to Pathology* 4th. 2016.
56. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*; 2004;25:747–806.
57. Cheng CY, Mruk DD. The biology of spermatogenesis: The past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365:1459–63.
58. World Health Organization. Infertility Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility> cited: 2021 feb 17.

59. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1520–4.
60. Pfeifer S, Butts S, Dumesic D, Fossum G, Gracia C, La Barbera A, et al. Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;103(3):e18–25.
61. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. 2010.
62. Lahdetie J. Occupation- and exposure-related studies on human sperm. *J Occup Environ Med*.. 1995;37(8):922–30.
63. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of Oxidative Stress in Pathogenesis of Varicocele and Infertility. *Urology*. 2009;73(3):461–9.
64. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*. 2018;110(5):810–4.
65. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol*. 2009;16(5):449–57.
66. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2007;2(2):219–36.
67. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1–40.

68. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2000;74(6):1200–7.
69. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6):835–50.
70. Aitken RJ. The Amoroso Lecture: The human spermatozoon - A cell in crisis? *J Reprod Fertil*. 1999;115(1):1–7.
71. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2004;81(2):349–54.
72. Henkel R, Schill W-B. Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia*. 2009;30(S1):91–7.
73. Fraczek M, Kurpisz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postep Hig Med Dosw*. 2005;59:523–34.
74. John Aitken R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7(4):659–68.
75. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(SUPPL.1):S81–90.
76. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18(1):1–14.
77. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016;24(5):547–53.

78. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(2):236–44.
79. Temidayo So, Stefan SP. Diabetes mellitus and male infertility. *Asian Pacific J Reprod.* 2018;7(1):6.
80. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility - A clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008;14(3):243–58.
81. Ahmed AM. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J;* 2002;23: 373–8.
82. Lakhtakia R. The history of diabetes mellitus. *Med J.* 2013;13: 368–70.
83. Eknayan G, Nagy J. A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005;12(2):223–9.
84. Egan AM, Dinneen SF. What is diabetes? *Med (United Kingdom).* 2019;47(1):1–4.
85. Rowley WR, Bezold C, Arikan Y, Byrne E, Krohe S. Diabetes 2030: Insights from Yesterday, Today, and Future Trends. *Popul Health Manag.* 2017;20(1):6–12.
86. Kahn R. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20(7):1183–97.
87. Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011;91(1):79–118.
88. Care D, Suppl SS. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetesd2018. *Diabetes Care.* 2018;41:13–27.
89. Taylor R. Type 2 diabetes: Etiology and reversibility. *Diabetes Care.* 2013;36(4):1047–55.

90. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3342.
91. Association AD. Gestational Diabetes Mellitus. Vol. 27, *Diabetes Care.* 2004;277:88–90.
92. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216–26.
93. Kim J, Shin S-H, Kang J-K, Kim JW. HX-1171 attenuates pancreatic β -cell apoptosis and hyperglycemia-mediated oxidative stress via Nrf2 activation in streptozotocin-induced diabetic model. *Oncotarget.* 2018;9(36):24260–71.
94. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Phys Res.* 2001;50: 537–46. A
95. Irer SV, Alper G. Deneysel Diyabet Modelleri. *Türk Klin Biyokim Derg.* 2004;2(3):127–36.
96. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ Transport and Cytotoxicity: Specific Enhancement in GLUT2-Expressing Cells. *Diabetes.* 1994;43(11):1326–33.
97. West E, Simon OR, Morrison EYSA. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J.* 1996;45(2):60–2.
98. Kurcer Z, Karaoglu D. The use of alloxan and streptozotocin in experimental diabetes models / Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanimi. *Turkish J Endocrinol Metab.* 2012;16(2):34–41.
99. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: Implications for male reproductive function. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1871–7.

100. Mallidis C, Agbaje IM, Rogers DA, Glenn J V., Pringle R, Atkinson AB, et al. Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes. *Int J Androl.* 2009;32(4):295–305.
101. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832:626–35.
102. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce tıp fak der.* 2005;7(3):30-39.
103. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010;48(5):425–35.
104. Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG. The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci* 2008;13(13):5187–94.
105. Gómez O, Ballester B, Romero A, Arnal E, Almansa I, Miranda M, et al. Expression and regulation of insulin and the glucose transporter GLUT8 in the testes of diabetic rats. *Horm Metab Res.* 2009;41(5):343–9.
106. Bartak V, Josifko M, Horackova M. Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil.* 1975;20(1):30–2.
107. Delfino M, Imbrogno N, Elia J, Capogreco F, Mazzilli F. Prevalence of diabetes mellitus in male partners of infertile couples. *Minerva Urol e Nefrol.* 2007;59(2):131–5.
108. Tremblay RR, Trottier L, Abele V, Nadeau A, Gagnon P. Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes on Insulin Binding Parameters in Adult Rat Testis. *Andrologia.* 1985;17(6):587–91.

109. Trindade AAT, Simões ACP, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT. Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(4):256–65.
110. Kim ST, Moley KH. Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction.* 2008;136(3):313–22.
111. Jelodar G, Khaksar Z, Pourahmadi M. Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. *J Physiol Sci.* 2009;59(5):377–82.
112. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14–3–3 in rat testis. *Life Sci.* 2007;81(13):1079–84.
113. Glina AH, Jabeen Q, Khan MAU. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *nigella sativa*. *Pakistan J Biol Sci.* 2004 Mar 15;7(4):441–51.
114. Rouhi-Boroujeni H, Majid A-S, Moradi MT. A review of the medicinal plants effective on headache based on the ethnobotanical documents of Iran. *Der Pharm Lett.* 2016;8(3):37–42.
115. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(5):337–52.
116. Kooti W, Asadi-Samani M, Afrisham R. The effects of hydro-alcoholic extract of celery on lipid profile of rats fed a high fat diet. *Artic Adv Environ Biol.* 2014;8(9):325–30.
117. Boskabady MH, Mohsenpoor N, Takaloo L. Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients. *Phytomedicine.* 2010;17(10):707–13.

118. Abel-Salam BKA. Immunomodulatory effects of black seeds and garlic on alloxan-induced Diabetes in albino rat. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012;40(6):336–40.
119. Beyrami A, Farokhi F, Samani-Asadi M. A study of the effect of prostodin and hydroalcoholic extract of *Malva neglecta* on kidney histopathology and renal factors in female rats. *Adv Environ Biol*. 2014;8(9):942–7.
120. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci*. 2009;85(23–26):830–4.
121. Tembhurne SV, Feroz S, More BH, Sakarkar DM. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa* (kalonji) seeds. *J Med Plants Res*. 2014;8(3):167–177.
122. Baynes john W, Thorpe SR. The role of oxidative stress in diabetic complications : Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 1996;3(4):277–84.
123. Sanz P. AMP-Activated Protein Kinase: Structure and Regulation. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9(5):478–92.
124. Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of *nigella sativa* seeds. *Pharm Biol*. 1993;31(2):96–100.
125. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the β -cells in the Islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tohoku J Exp Med*. 2003 Dec;201(4):213–9.
126. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci*. 2005;79(3):219–23.
127. Yaman I, Balikci E. Protective effects of *nigella sativa* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(2):183–90.

128. Ping NC, Hashim NH, Hasan Adli DS. Effects of *Nigella sativa* (Habbatus sauda) oil and nicotine chronic treatments on sperm parameters and testis histological features of rats. *Evid based Complement Altern Med*. 2014;2014.
129. Mohammad M, Mohammad MA, Mohamad MM, Dradka H. Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on spermatogenesis and fertility of male albino rats. *Res J Med Med Sci*. 2009;4(2):386–90.
130. Zohra Ghilissi. Effect of *Nigella sativa* seeds on reproductive system of male diabetic rats. *African J Pharm Pharmacol*. 2012;6(20):1444–50.
131. Mahdavi R, Heshmati J, Namazi N. Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on male infertility: A systematic review. *J Herb Med*. 2015;5(3):133–9.
132. Kanigür-Sultuybek G, Ozdas ŞB, Curgunlu A, Tezcan V, Onaran I. Does metformin prevent short term oxidant-induced DNA damage? In vitro study on lymphocytes from aged subjects. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2007;18(2):129–40.
133. Sahra I Ben, Marchand-Brustel Y Le, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: A new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther*. 201;9(5):1092–9.
134. Holman RR, Cull CA, Fox C, Turner RC. United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS) 13: Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. *Br Med J*. 1995;310(6972):83–8.
135. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of Metformin in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1995;333(9):541–9.
136. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996;334(9):574–9.
137. Johansen K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM: Meta-analysis. *Diabetes Care*. 1999;22(1):33–7.

138. Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: New understandings, new uses. *Drugs*. 2003;63(18):1879–94.
139. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):251–62.
140. Dunn CJ, Peters DH. Metformin: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Non—Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Drugs*. 1995;49(5):721–49.
141. Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol*. 1994;4(4):315–24.
142. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167–74.
143. Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2014;7:241–53.
144. Kinaan M, Ding H, Triggle CR. Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. *Med Princ Pract* 2015;24(5):401–15.
145. Diniz Vilela D, Gomes Peixoto L, Teixeira RR, Belele Baptista N, Carvalho Caixeta D, Vieira De Souza A, et al. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
146. Phé V, Rouprêt M. Erectile dysfunction and diabetes: A review of the current evidence-based medicine and a synthesis of the main available therapies. *Diabetes Metab*. 2012;38(1):1–13.

147. Sermondade N, Dupont C, Faure C, Boubaya M, Cédric-Durnerin I, Chavatte-Palmer P, et al. Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. *Asian J Androl.* 2013;15(5):626–9.
148. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl.* 2013;15(5):622–5.
149. Andrzejewski S, Gravel S-P, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* 2014;2(1):12.
150. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348(3):607–14.
151. Ghasemnejad-Berenji M, Ghazi-Khansari M, Yazdani I, Nobakht M, Abdollahi A, Ghasemnejad-Berenji H, et al. Effect of metformin on germ cell-specific apoptosis, oxidative stress and epididymal sperm quality after testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia.* 2018;50(2).
152. Alves MG, Martins AD, Vaz C V., Correia S, Moreira PI, Oliveira PF, et al. Metformin and male reproduction: Effects on Sertoli cell metabolism. *Br J Pharmacol.* 2014;171(4):1033–42.
153. Faure M, Bertoldo MJ, Khoeiry R, Bongrani A, Brion F, Giulivi C, et al. Metformin in Reproductive Biology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:675.
154. R. Dias T, D. Martins A, P. Reis V, Socorro S, M. Silva B, G. Alves M, et al. Glucose Transport and Metabolism in Sertoli Cell: Relevance for Male Fertility. *Curr Chem Biol.* 2014;7(3):282–93.

155. Labazi H, Wynne BM, Tostes R, Webb RC. Metformin treatment improves erectile function in an angiotensin II model of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2013;10(9):2154–64.
156. Meneses JM, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF. The Antidiabetic Drug Metformin and Male Reproductive Function: An Overview. *Int J Diabetol Vasc Dis Res.* 2015 Apr 20;1–2.
157. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, et al. Vitamin E. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):913–38.
158. Evans HM, Scott Bishop K. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science.* 1922;1(1458):650–651.
159. Niki E, Traber MG. A history of vitamin e. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(3):207–12.
160. Horwitt MK. Vitamin E: a reexamination. *Am J Clin Nutr.* 1976;29(5):569–78.
161. Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BN. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(6):714–722.
162. Fritsma GA. Vitamin E and autoxidation. *Am J Med Technol.* 1983;49(6):453–6.
163. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, et al. Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry.* 1993;32(40):10692–9.
164. Mustacich DJ, Bruno RS, Traber MG. Vitamin E. *Vitam Horm.* 2007;76:1–21.
165. Huang HY, Caballero B, Chang S, Alberg A, Semba R, Schneyer C, et al. Multivitamin/mineral supplements and prevention of chronic disease. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2006;(139):1–117.

166. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *Am Pharm.* 1994;34(9):26–35.
167. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991;161(4):488–503.
168. Gavazza M, Catalá A. The effect of α -tocopherol on the lipid peroxidation of mitochondria and microsomes obtained from rat liver and testis. *Mol Cell Biochem.* 2001;225(1–2):121–8.
169. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol.* 1993;16(1 S):6–9.
170. Burton GW, Doba T, Gabe EJ, Hughes L, Lee FL, Prasad L, et al. Autoxidation of Biological Molecules. 4. Maximizing the Antioxidant Activity of Phenols. *J Am Chem Soc.* 1985;107(24):7053–65.
171. Traber MG, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Hidaka H, Malloy M, et al. Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 1992;33(8):1171–82.
172. Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:347–62.
173. Riemersma RA, Wood DA, Oliver MF, Elton RA, Macintyre CCA, Gey KF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet.* 1991;337(8732):1–5.
174. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* 2009;89(1):27–71.
175. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(2):167–78.

176. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000;49(1):27–29.
177. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Br Med J*. 1997;315(7109):629–34.
178. Hamer M, Chida Y. Intake of fruit, vegetables, and antioxidants and risk of type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2007;25(12):2361–9.
179. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes: New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care*. 1999;14(1):68–72.
180. Gökkuşu C, Palanduz Ş, Ademoğlu E, Ş. T. Oxidant and antioxidant systems in NIDDM patients: Influence of vitamin E supplementation. *Endocr Res*. 2001;27(3):377–86.
181. Lucesoli F, Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and α -tocopherol supplementation. *Toxicology*. 1999;132(2–3):179–86.
182. Konen JC, Summerson JH, Kirk JK. Measurement feasibility of advanced glycated end-products from skin samples after antioxidant vitamin supplementation in patients with type 2 diabetes. *J Nutr Heal Aging*. 2000;4(2):81–4.
183. Carroll MF, Schade DS. Timing of antioxidant vitamin ingestion alters postprandial proatherogenic serum markers. *Circulation*. 2003;108(1):24–31.
184. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl*. 2003;49(2):83–94.
185. Mather JP, Saez JM, Dayt F, Haour F. Vitamin E prolongs survival and function of porcine Leydig cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1983;102(3):470–5.

186. Naziroğlu M, Butterworth PJ, Sonmez TT. Dietary vitamin C and E modulates antioxidant levels in blood, brain, liver, muscle, and testes in diabetic aged rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2011;81(6):347–57.
187. De lamirande E, Gagnon C. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: I. Effects on the Motility of Intact Spermatozoa and on Sperm Axonemes. *J Androl.* 1992;13(5):368–78.
188. Suleiman SA, Elamin Ali M, Zaki ZMS, El-Malik EMA, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996;17(5):530–7.
189. Paolisso G, Tagliamonte MR, Barbieri M, Zito GA, Gambardella A, Varricchio G, et al. Chronic vitamin E administration improves brachial reactivity and increases intracellular magnesium concentration in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(1):109–15.
190. Manzella D, Barbieri M, Ragno E, Paolisso G. Chronic administration of pharmacologic doses of vitamin E improves the cardiac autonomic nervous system in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(6):1052–7
191. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239–57.
192. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582–92.
193. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *BioFactors.* 1998;8(1–2):1–5.
194. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşif Kyanak Tarama Derg.* 2011;20(3):158.

195. Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(1):35–42.
196. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367–401.
197. Erdoğan B, Uzaslan E. Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis. *Türkiye Klin Arch Lung.* 2003;4:165–74.
198. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
199. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277–88.
200. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity.* 2005;22(3):355–70.
201. Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol Adv.* 2019;37(3):459–75.
202. Luo LJ, Liu YP, Yuan X, Zhang GP, Hou N, Wu XQ, et al. Leptin attenuates the contractile function of adult rat cardiomyocytes involved in oxidative stress and autophagy. *Acta Cardiol Sin.* 2016;32(6):723–30.
203. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet.* 1993;341(8855):1251–4.
204. Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E, Van Den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(6):821–31.

205. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175–93.
206. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*; 2007;19(5):488–946.
207. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(39):13944–9.
208. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J.* 2018;285(3):416–31.
209. Goddard-Zandman G, Blank M. Apoptosis and Autoimmunity. *Isr Med Assoc J.* 2002;4(9):722–4.
210. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3–4):325–31.
211. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: Apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene.* 2001;20(17):2122–33.
212. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* 2008;19(1):55–63.
213. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 Type I/Type II model. *Semin Immunol.* 2003;15(3):185–93.
214. Wali J, Masters S, Thomas H. Linking Metabolic Abnormalities to Apoptotic Pathways in Beta Cells in Type 2 Diabetes. *Cells.* 20;2(2):266–83.

215. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Prog Horm Res.* 1996;51:433–55.
216. Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl.* 1998;19(4):487–97.
217. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol.* 2007;23(4):578–87.
218. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3–4):719–25.
219. Abike F, Zengeroğlu S. Epitelyal over karsinomlarında pcna ekspresyonu . *Türk Hij ve Deney Biyol Derg.* 2010;67(4):173–8.
220. Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):269–82.
221. Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature.* 1987;326(6112):471–5.
222. Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature.* 1987;326(6112):517–20.
223. Lee SH, Pan ZQ, Kwong AD, Burgers PM, Hurwitz J. Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon in vitro. *J Biol Chem.* 1991 Nov 25;266(33):22707–17.
224. Krishna TSR, Kong XP, Gary S, Burgers PM, Kuriyan J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell.* 1994;79(7):1233–43.

225. Takahashi T, Caviness VS. PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol.* 1993;22(12):1096–102.
226. Sen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdoğan B. Meningiomlarda Histopatolojik Tanının Flowsitometrik DNA Analizi, PCNA ve KI-67 ile Korelasyonu. *Türk Nöroşirürji Derg.* 2002;12:48–53.
227. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol.* 1990;160(2):93–102.
228. Paunesku T, Mittal S, Protić M, Oryhon J, Korolev S V., Joachimiak A, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol.* 2001;77(10):1007–21.
229. Funakoshi Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Doi K. Cellular Proliferative and Telomerase Activity in Canine Mammary Gland Tumors. *Vet Pathol.* 2000;37(2):177–83.
230. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, Van Noorden S, Price Y, Lane DP, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol.* 1991;165(2):173–8.
231. Punithavathi VR, Stanely Mainzen Prince P, Kumar MR, Selvakumari CJ. Protective effects of gallic acid on hepatic lipid peroxide metabolism, glycoprotein components and lipids in streptozotocin-induced type II diabetic wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011;25(2):68–76.
232. Yuan X, Ni H, Chen X, Feng X, Wu Q, Chen J. Identification of therapeutic effect of glucagon-like peptide 1 in the treatment of STZ-induced diabetes mellitus in rats by restoring the balance of intestinal flora. *J Cell Biochem.* 2018 119(12):10067–74.

233. Houcher Z, Boudiaf K, Benboubetra M, Houcher B. Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines*. 2007;18(1):8–18.
234. Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mobark M, Kfoury H, Mansour MA. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chem Biol Interact*. 2011;192(3):233–42.
235. Sahinturk V, Guclu C, Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian J Androl*. 2007;9(1):117–24.
236. Tas M, Cirit Ü, Ozkan O, Zincircioğlu SB, Seker U, Ozmen M, et al. Protective Role of Vitamin C on Sperm Characteristics and Testicular Damage in Rats Exposed to Radiation . *KAFKAS Univ Vet Fak Derg*. 2014;20(1):59–64
237. Alp H, Cirit U, Tas M, Rifaioglu MM, Hatipoglu NK, Aytekin I, et al. Effects of sildenafil citrate, isoniazid, and streptomycin on testicular tissue and epididymal semen quality in rats. *Urology*. 2012;80(4):953
238. Baran A, Bacinoglu S, Alkan S, Demir K, Ak K, Kamuran I. Freezing of Cat Semen in Straws with Different Glycerol Levels Containing Tris Extender. *Turk J Vet Anim Sci*. 2004;28.
239. Kaplanoglu GT, Bahcelioglu M, Gozil R, Helvacioglu F, Buru E, Tekindal MA, et al. Effects of green tea and vitamin E in the testicular tissue of streptozotocin-induced diabetic Rats. *Saudi Med J*. 2013;34(7):734–43.
240. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Horm Res Paediatr*. 1970;1(1):2–25.

241. Take G, Ilgaz C, Erdogan D, Ozogul C, Elmas C. A comparative study of the ultrastructure of submandibular, parotid and exocrine pancreas in diabetes and fasting. *Saudi Med J*. 2007;28(1):28–35.
242. Macit S, Akbulut G. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Bes Diy Derg*. 2015;43(1):59-65.
243. Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: Morphological and functional alterations. *Andrologia*. 2009;41(6):361–8.
244. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The Histological, Histomorphometrical and Histochemical Changes of Testicular Tissue in the Metformin Treated and Untreated Streptozotocin- induced adult diabetic rats. *Archive of SID*. 2011;2(1):13–24.
245. Al-Sa'aidi J, Al-Khuzai ALD, Al-Zobaydi NFH. Effect of alcoholic extract of *Nigella sativa* on fertility in male rats. *Iraqi J Vet Sci*. 2008;23:123-128.
246. Abbasi Z, Fatemi Tabatabaei SR, Mazaheri Y, Barati F, Morovvati F. Effects of sesame oil on the reproductive parameters of diabetes mellitus-induced male rats. *World J Mens Health* 2013;31(2):141-149.
247. Xu Y, Lie, H Guan R, Gao Z, et.al. Studies on the mechanism of testicular dysfunction in the early stage of a streptozotocin induced diabetic rat model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450:87-92.
248. Jackson FL, Hutson JC. Altered responses to androgen in diabetic male rats. *Diabetes*. 1984;33(9):819–24.
249. Ford WCL, Hamilton DW. The Effect of experimentally induced diabetes on the metabolism of glucose by seminiferous tubules and epididymal spermatozoa from the rat. *Endocrinology*. 1984;115(2):716–22.

250. Oksanen A. Testicular lesions of streptozotocin diabetic rats. *Horm Res.* 1975;6(3):138–44.
251. Anderson JE, Jones D, Penner SB, Thliveris JA. Primary hypoandrogenism in experimental diabetes in the Long-Evans rat. *Diabetes.* 1987;36(10):1104–10.
252. Punithavathi VR, Anuthama R, Stanely Mainzen Prince P. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. *J Appl Toxicol.* 2008;28(6):806–13.
253. Almeida DAT, Braga CP, Novelli ELB, Fernandes AAH. Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2012;55(4):527–36.
254. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec.* 1985;213(1):53–62.
255. Rossi GL, Aeschlimann M. Morphometric Studies of Pituitary Glands and Testes in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Andrologia.* 1982;14(6):532–42.
256. Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F, Shihab-Eldeen A, Omu AE, et al. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int.* 2005;96(1):175–80.
257. Anderson JE, Thliveris JA. Testicular histology in streptozotocin-induced diabetes. *Anat Rec.* 1986;214(4):378–82.
258. Ali ST, Shaikh RN, Siddiqi NA, Siddiqi PQR. Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Syst Biol Reprod Med.* 199;30(1):47–54.

259. Altay B, Çetinkalp Ş, Doğanavşargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril*. 2003;80(2):828–31.
260. Hassan GMA, Moneium TA. Structural changes in the testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Suez Canal Med J*. 2001;4(1):17–25.
261. Mohasseb M, Ebied S, Yehia MAH, Hussein N. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2011;67(2):185–94.
262. Wright JR, Yates AJ, Sharma HM, Shim C, Tigner RL, Thibert P. Testicular atrophy in the spontaneously diabetic BB Wistar rat. *Am J Pathol*. 1982;108(1):72–9.
263. Abrahamson DR. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol*. 1986;149:257–78.
264. Rohrbach DH, Martin GR. Structure of basement membrane in normal and diabetic tissue. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;401(1):203–9.
265. 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(4):354–60.
266. Khorramabadi KM, Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Mirjalili A. Protective effect of vitamin E on oxidative stress and sperm apoptosis in diabetic Mice. *Int J Repro BioMed*. 2018;17(2):127-134.
267. Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M. Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. *Andrology*. 2019;7(1):110-123.

268. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):117–23.
269. Fakher SH, Djalali M, Tabei S, Zeraati H, Javadi E, Sadeghi MR, et al. Effect of Vitamins A, E, C and Omega-3 Fatty Acids on Lipid Peroxidation in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian J Publ Health.* 2007;36(2):58-63.
270. Abdella Baragob AE, AlMalki WH, Farag Alla HEH, Ibrahim A, Muhammed SK, Abdella S. Investigate evaluation of oxidative stress and lipid profile in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. *Pharm.* 2014;05(03):272–9.
271. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(1):24–38.
272. Anderson JE, Thliveris JA. Morphometry and cytochemistry of leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat.* 1987;180(1):41–8
273. Sampannang A, Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Iamsaard S. Comparison of male reproductive parameters in mice with type 1 and type 2 diabetes. *Clin Exp Reprod Med.* 2020;47(1):20–33.
274. Paz G, Homonnai ZT. Leydig cell function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experientia.* 1979;35(10):1412–3.
275. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology.* 1997;49:508–13.
276. 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(4):243–54.
277. Tarleton GW, Gondos B, Formby B. Testicular alterations in the nonobese diabetic mouse. *Endocr Pathol.* 1990;1(2):85–93.

278. Bondarenko LB, Shayakhmetova GM, Matvienko A V, Kovalenko VM. Diabetes-mediated changes in rat type I collagen and spermatogenesis indices. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.* 2012;19(3):245–54.
279. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran J Basic Med Sci.* 2012;15(1):623–35.
280. Murray FT, Cameron DF, Orth JM. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism.* 1983;32(1):141–7.
281. Kaya M. Sertoli cells and various types of multinucleates in the rat seminiferous tubules following temporary ligation of the testicular artery. *J Anat.* 1986;144:15–29.
282. León MD, Chiauzzi VA, Calvo JC, Charreau EH, Chemes HE. Acute hCG administration induces seminiferous tubule damage in the adult rat. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.* 1987;37(2):277–88.
283. Cernochová D, Kamarád V. Toxic effect of lead of mice testicles after its administration with drinking water. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 1992;133:9–13.
284. Torgersen HM, Rován E, Steiner M, Frick J, Adam H. BCG-induced orchitis: Structural changes during the degeneration of seminiferous tubules of rats and rabbits. *Urol Res.* 1982;10(2):97–104.
285. Sasagawa I, Nakada T, Kubota Y, Ishigooka M, Uchida K, Doi K. In Vivo ³¹P Magnetic Resonance Spectroscopy for Evaluation of Testicular Function in Cryptorchid Rats. *J Urol.* 1995;154(4):1557–9.
286. Fox B. *Oxford Textbook of Pathology.* Br Med J. 199;305(6854):658–9.

287. Hikim APS, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*; 1999;4:38–47.
288. Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M. Diabetes-induced testicular oxidative stress, inflammation, and caspase-dependent apoptosis: the protective role of metformin. *Arch Physiol Biochem*. 2020;126(5):377-388.
289. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology*. 2006;66(9):2056–67.
290. Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res*. 2001;892(2):255–62.
291. AL-Okbi S, Ammar NM, Abdel Kader MN. Studies of some biochemical, Nutritional and anti-inflammatory effect of *Nigella sativa* seeds. *Egypt J Pharm Sci*. 2000;38: 457- 469.
292. Kanter M, Coskun O, Gurel A. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on cadmium-induced oxidative stress in the blood of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2005;107(3):277–87.
293. Schneider C, Segre T. Green tea: Potential health benefits. *Am Fam Physician*. 2009;79(7):591–4.



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

9 ÖZGEÇMİŞ

Adı	Seval	Soyadı	KAYA
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C	Tel	
E-posta			

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2017 – devam etmekte
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	Dicle Üniversitesi/Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	2012

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL/	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	60,00							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2017/Sonbahar)	82,97678		
(Diğer) Puanı			

10 EKLER

10.1 Etik kurul onayı

T.C.DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN BENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DÜHADEK)

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	TOPLANTI SAYISI
28.03/2019	1	2

KARAR
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi / Histoloji ve Embriyoloji ABD Prof.Dr. Yusuf NERGİZ 'i yürütücüsü olduğu, Doçtora Öğr. Seval KAYA, Biyolog Uğur ŞEKER'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Çörek Otu Yağı, Metformin ve Vitamin-E' nin Deneysel Diyabetik Ratlarda Fertilite Potansiyeli, Testiküller ve Spermatolojik Karakter Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması" başlıklı ve 2019004 protokol numaralı çalışması;

Deney Hayvanına	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan	Erkek	30	20-25 Haftalık, 200-250 gr

Etik kurulunuzca görüşülmüş olup araştırmanın oy birliği ile desteklenmiştir.

KATILIMCILARIN

ÜNVANI	ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr.	Beyan YOKUŞ	(BAŞKAN) RAPORTÖR	
Doç. Dr.	Serçak TÜRK	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Hasan AKKOÇ	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Ayşe MEŞE	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Karagözen DEMİREL	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Mehmet Bulent AKBALIK	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Mehmet Hüseyin ALKAN	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Feray ALTAN	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Uluğ ALABALIK	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Enar UYSAL	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Hüsnü VARDAN ORAL	(ÜYE)	
Yrd. Doç. Dr.	Akın KOÇHAN	(ÜYE)	
Veteriner Hekim	İlyas ALAK	(ÜYE)	
Avukat	Abdullah YAVUZ	(ÜYE)	
Öğrenci	M. Yavuz KAHRAMAN	(ÜYE)	

KYK-FRM-307/C0

Belliğine: DÜŞTAM binası, Zeytin K.Ü. DÜŞAM laboratuvarları (Hidayet Fok. Karşısı) 21280 Sur /DİYARBAKIR
E-posta: dussam@du.edu.tr Sekreterya: 0 412 248 8431 (3955) Tel: Hekim: 0 412 2488001-16 Fax: 4423

