

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
DİYABET MODELİNDE ETİL PİRÜVAT'IN
SIÇAN TESTİSİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YAVUZ GENÇ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970173

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
DİYABET MODELİNDE ETİL PİRÜVAT'IN
SIÇAN TESTİSİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

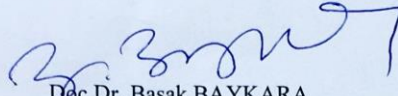
YAVUZ GENÇ

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Başak BAYKARA

(Bu araştırma TÜBİTAK 1002- Hızlı Destek Programı tarafından 216S259 Proje Numarası ile desteklenmiştir)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970173

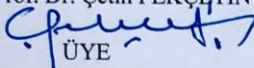
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi
Yavuz GENÇ. **“DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE
ETİL PİRÜVAT’IN SIÇAN TESTİSİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ”** konulu Yüksek
Lisans tezini 08/03/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



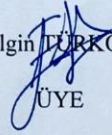
Doç.Dr. Başak BAYKARA

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

ÜYE

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Serap CİLAKE MICİLİ

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İçindekiler Tablosu

İÇİNDEKİLER.....	i
SEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLO DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ	7
<i>2.1.1. Erkek Üreme Sistemine Genel Bir Bakış.....</i>	<i>7</i>
<i>2.1.2. Erkek Genital Sisteminin Gelişimi.....</i>	<i>8</i>
<i>2.1.3. Gonadların Gelişimi</i>	<i>8</i>
<i>2.1.4. Farklanmamış Gonad.....</i>	<i>8</i>
<i>2.1.5. Cinsiyetin Belirlenmesi.....</i>	<i>9</i>
<i>2.1.6. Testislerin Gelişimi.....</i>	<i>11</i>
<i>2.1.7. Testis Anatomisi.....</i>	<i>12</i>
<i>2.1.8. Testis Histolojisi.....</i>	<i>14</i>
<i>2.1.8.1. Seminifer Tübül Histolojisi.....</i>	<i>16</i>
<i>2.1.8.1.1. Sertoli Hücreleri</i>	<i>17</i>
<i>2.1.8.1.2. Spermatogenik Hücreler</i>	<i>19</i>
2.2. HİPOTALOMO-HİPOFİZ-GONAD AKSI.....	26
2.3. DİYABET	28
2.4. ETİL PİRÜVAT.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. ARAŞTIRMA TİPİ	33
3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	33
3.3. ARAŞTIRMA EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI.....	33
<i>3.3.1. DM modeli oluşturulması.....</i>	<i>34</i>
<i>3.3.2. Etıl Pirüvat uygulaması.....</i>	<i>34</i>

3.3.3.Deneklerin yaşamı sonlandırma zamanı ve yöntemi.....	34
3.4.ÇALIŞMA MATERYALİ	35
3.5.ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ	35
3.6.VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	35
3.6.1.Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	35
3.6.2.Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	35
3.6.2.1.Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	36
3.6.2.2.Denek Kan Değerlerinin Ölçümü	36
3.6.2.3.Histokimyasal İncelemeler.....	36
3.6.2.3.1.Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	38
3.6.2.3.2.Hematoksilen-Eozin Boya Yöntemi	38
3.6.2.3.3.Masson Trikrom Boyama Yöntemi	39
3.6.2.3.4.Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemi.....	41
3.6.2.4.İmmünohistokimyasal İncelemeler	42
3.6.2.4.1.TUNEL Boyama Yöntemi	42
3.6.2.4.2.Aktif Kaspaz-3 Boyama Yöntemi	43
3.6.2.5.Biyokimyasal İncelemeler	43
3.6.2.5.1.MDA, GSH ve GPx Düzeylerinin Saptanması	44
3.7.ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ.....	45
3.8.VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	46
3.9.ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI	46
3.10.ETİK KURUL ONAYI.....	46
4.BULGULAR	47
4.1.DENEK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	47
4.2.DENEK KAN GLİKOZ SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	48
4.3.HİSTOLOJİK BULGULAR	49
4.3.1.Işık Mikroskopik Bulgular	49
4.3.1.1.Hematoksilen-Eozin Boyama Değerlendirmesi	49
4.3.1.1.1.Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	54
4.3.1.1.2.Seminifer Tübül Çap Ölçümü	55
4.3.1.2.PAS Boyama Değerlendirmesi.....	55
4.3.1.3.Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi	59
4.3.2.İmmünohistokimyasal Bulgular	64

<i>4.3.2.1.TUNEL Boyama Değerlendirmesi.....</i>	<i>64</i>
<i>4.3.2.2.Aktif Kaspaz 3 Boyama Değerlendirmesi.....</i>	<i>67</i>
4.4.BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	70
<i>4.4.1.MDA Düzey Değerlendirmesi</i>	<i>70</i>
<i>4.4.2.GSH Düzey Değerlendirmesi</i>	<i>71</i>
<i>4.4.3.GPx Düzey Değerlendirmesi</i>	<i>72</i>
<u>5.TARTIŞMA.....</u>	<u>73</u>
<u>6.SONUÇ VE ÖNERİLER</u>	<u>81</u>
<u>7.KAYNAKLAR.....</u>	<u>82</u>
<u>8.EKLER</u>	<u>88</u>
8.1. EK-1 TÜBİTAK PROJE DESTEK BELGESİ	88
8.2. EK-2 ETİK KURUL RAPORU	89
8.3.EK-3 ÖZGEÇMİŞ.....	90

SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Erkek üreme sistemini gösteren şematik diyagram	7
Şekil 2: Gelişmekte olan erkek cinsiyet üreme organları üzerindeki hormonal etkinin diyagramı	10
Şekil 3: Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı	12
Şekil 4: Testis ve seminifer tübül şematik diyagramları.....	15
Şekil 5: Testisin perifer kesit (kısmi görüntüsü) şematik diyagramı.	16
Şekil 6: Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri şematik diyagramı	17
Şekil 7: Spermatogenetik seri hücrelerinin bölünme ve farklılaşmasını gösteren şematik diyagram.....	19
Şekil 8: Gelişimlerinin farklı evrelerindeki spermatogonyumlar ve spermatidleri gösteren seminifer tübüllerin enine kesiti.	22
Şekil 9: Spermiogenezis şematik diyagramı	23
Şekil 10: Seminifer tübül ve interstisyel aralık.....	25
Şekil 11: Erkek üreme fonksiyonunun hormonal düzenlenişi gösteren diyagram.	27
Şekil 12: Glikolizis'in şematik diyagramı.	30
Şekil 13: Etil pirüvat'ın yapısı.....	31
Şekil 14: Deney sonunda testislerin elde edilmesi.....	34
Şekil 15: Deney için kan glikoz değerlerinin ölçümü.....	36
Şekil 16: Denek ağırlıklarının değerlendirilmesi.....	47
Şekil 17: Kan glikoz seviyeleri değerlendirmesi.	49
Şekil 18: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri.	50
Şekil 19: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri.	51
Şekil 20: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri.	52
Şekil 21: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri.	53
Şekil 22: Johnsen Testiküler Skorlaması.	54
Şekil 23: Seminifer tübül çapı değerleri.	55
Şekil 24: Bazal membran kalınlığı.....	56
Şekil 25: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.....	57
Şekil 26: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	57
Şekil 27: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.....	58
Şekil 28: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.....	58
Şekil 29: Tunika albuginea ölçüm değerleri.	59
Şekil 30: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.	60

Şekil 31: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.....	61
Şekil 32: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.	62
Şekil 33: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.	62
Şekil 34: TUNEL pozitif (+) hücre sayısı.....	64
Şekil 35: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.....	65
Şekil 36: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	65
Şekil 37: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	66
Şekil 38: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	66
Şekil 39: Aktif kaspaz-3 değerlendirmesi.....	67
Şekil 40: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri.....	68
Şekil 41: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri.	68
Şekil 42: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri.	69
Şekil 43: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri.	69
Şekil 44: MDA düzey değerlendirmesi.	70
Şekil 45: GSH düzey değerlendirmesi.....	71
Şekil 46: GPx düzey değerlendirmesi.....	72

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: DM etiyolojik sınıflandırması.....	29
Tablo 2: Doku takip protokolü	37
Tablo 3: Johnsen Testiküler Skorlaması.	38
Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	39
Tablo 5: Masson Trikrom boyama protokolü.....	40
Tablo 6: Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü	42
Tablo 7: Seminifer tübül çapı, tunika albiginea ve bazal membran kalınlığı değerleri	63
Tablo 8: MDA, GSH, GPX değerleri	72



KISALTMALAR

DM: Diabetes Mellitus

EP: Etil Pirüvat

PAS: Periyodik Asit Schiff

MDA: Malondialdehit

GSH: Glutasyon

GPX: Glutasyon Peroksidaz

İ.P: İntraperitoneal

STZ: Streptozotosin

HPG: Hipotalamus-Hipofiz-Gonad

GnRH: Gonadotropik Serbestleştirici Hormon

LH: Luteinize Edici Hormon

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

TBF: Testis Belirleyici Faktör

SRY: Sex-determining Region on Y

hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin

MIS: Mülleriye-inhibe Edici Madde

AMH: Antimüllerian Hormon

DHT: Dihidrotestosteron

TBG: Testosteron Binding Globülin

LTH: Luteotropik Hormon

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ADA: Amerikan Diyabet Derneği

LADA: Erişkin Latent Otoimmün Diyabet

REPS: Ringer Etil Pirüvat Solüsyonu

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

TdT: Deoksinükleotidil Transferaz

DAB: Diaminobenzidine

GR: Glutasyon Redüktaz

GSSH: Okside Glutasyon

C60HyFn: Hidratlı C60 Fullerene

STBM: Seminifer Tübül Bazal Membran

QE: Quercetin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve desteğini esirgemeyen, öğrenim hayatımda bana sabır ve anlayış içerisinde yaklaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Başak BAYKARA'ya,

Histoloji ve Embriyoloji alanında ve hayata dair bilgi ve deneyimlerini aktararak bana katkıda bulunan değerli hocalarım Prof.Dr.H. Alper BAĞRIYANIK, Prof.Dr.Ülker CANKURT, Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN, Prof.Dr.İşıl TEKME, Prof.Dr.Bekir ERGÜR, Prof.Dr.Güven Erbil, Prof.Dr.Kazım TUĞYAN, Doç.Dr.Seda ÖZBAL, Doç. Dr.Serap CİLAKER MICİLİ'ye,

Biyokimyasal analiz aşamalarında ve öğrenim hayatım boyunca vermiş olduğu bilgi, destek ve yardımlardan dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Prof.Dr.Müge KIRAY'a

Tezimde jüri üyeliği yaparak bana katkıda bulunan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesinden Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinden Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Biyolog Özcan ÜSTÜN'e

Yüksek lisansa başladığımdan beri her zaman yanımda olan ve çalışmalarında katkıda bulunan değerli arkadaşlarım; Meltem AVCI, Selma AYDEMİR, Uygur SAÇIK, Nevin ERSOY, Pınar AKOKAY, Hüseyin KISAOĞLU, Feyyaz ÖZEL, Merve AKSOY, Tuğçe TOPCU, Merve TÜTÜNCÜ, Gökçen BİLİCİ, Merve TATLI, Dr. Betül ATIŞ'a

Her zaman yanımda olan maddi manevi bana destek olan ve bana öğrenim hayatım boyunca kardeşi gibi davranan Ahmet KIRBULUT'a

TÜBİTAK, 1002 kapsamında 216S259 proje numarası ile bu araştırmayı desteklemiştir. Bu destekten dolayı TÜBİTAK'a

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, tökezlediğimde bana yol gösteren ve yardımcı olan, kendilerinden önce beni düşünen Aileme teşekkürlerimi sunarım.

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE ETİL PİRÜVAT'IN SIÇAN TESTİSİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YAVUZ GENÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı,

Balçova, İzmir, gncyvz61@gmail.com

ÖZET

Amaç:

Diabetes Mellitus (DM) modeli oluşturulan erkek sıçanlarda DM'nin testis yapısında oluşturduğu hasarı incelemek ve bu hasarda Etil Pirüvat'ın (EP) etkisini, histokimyasal (Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom, Periyodik Asit Schiff (PAS), immunohistokimyasal (Aktive Kaspaz-3 ve TUNEL) ve biyokimyasal [Malondialdehit (MDA), Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx)] olarak göstermektir.

Metod: Çalışmada deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi

1.Grup. Kontrol Grubu: Hiçbir madde uygulanmayacak, bazal değerler için kullanılacak gruptur. Deney başladıktan sonraki 18. günde tüm denekler sakrifiye edildi ve testis doku örnekleri alındı.

2.Grup. Etil Pirüvat Grubu: Deneklere deney başlangıcının 3. gününden itibaren 18. güne kadar günde iki defa intraperitoneal (i.p.) yolla 50 mg/kg Etil Pirüvat verildi. 18. gün sakrifiye edildi.

3.Grup. Diyabet Grubu: Deneklere ilk gün i.p yolla tek doz 45 mg/kg streptozotosin (STZ) verildi. 18. gün sakrifiye edildi.

4.Grup. Diyabet ve Etil Pirüvat Grubu: Deneklere ilk gün i.p yolla tek doz 45 mg/kg STZ verildi. Deney başlangıcının 3. gününden itibaren 18. güne kadar günde iki defa i.p yolla 50 mg/kg Etil Pirüvat verildi. 18. gün sakrifiye edildi.

Histolojik ve morfometrik incelemeler için deneklerden alınan sağ testiste Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom, Periyodik Asit Schiff (PAS), immünohistokimyasal olarak; TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 boyamaları yapıldı. Biyokimyasal incelemeler için deneklerden alınan sol testiste GSH, GPx, MDA düzeyleri incelendi.

Bulgular:

Yapılan histokimyasal incelemelerde, kontrol grubunda normal testis yapısı gözlemlendi. Diyabet grubunda; bazal membran kalınlaşması, bazal membran ondülasyonu, seminifer tübüllerde vakuolizasyon, germ hücre kaybı ve interstisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi. Etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat gruplarında Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom, PAS boyamaları ve Johnsen skorlaması yapıldığında normale yakın testis yapısı gözlemlendi.

İmmünohistokimyasal olarak TUNEL ve kaspaz-3 boyamaları yapılarak testis doku örneklerinde pozitif hücre aktivasyonuna bakıldı. Kontrol grubuna göre diyabet grubunda apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak arttığını belirledik. Diyabet+ etil pirüvat grubuyla diyabet grubu kıyaslandığında, diyabet+ etil pirüvat grubunda apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma olduğunu gözlemledik.

Biyokimyasal incelemelerde, GPx, GSH ve MDA değerlendirildi. MDA'nın, diyabet grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını, GSH ve GPx'in ise anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. MDA değerleri için diyabet grubu ile etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat grupları kıyaslandığında, etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat gruplarında anlamlı bir azalmanın olduğunu gözlemledik. Ayrıca diyabet grubuna göre etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat gruplarında GSH ve GPx değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu.

Sonuç:

Çalışmamızda STZ ile oluşturulan diyabette testis dokularında oluşan hasarı, etil pirüvat tedavisinin azalttığını bulduk.

Anahtar kelimeler;

Tip 1 DM: Tip 1 Diabetes Mellitus, EP: Etil Pirüvat, Testis, Sıçan

AN EXAMINATION OF THE EFFECTS OF ETHYL PYRUVATE ON THE RAT TESTIS IN AN EXPERIMENTAL DIABETES MODEL

YAVUZ GENÇ

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology,
Balçova, İzmir, gncyvz61@gmail.com

ABSTRACT

Objective:

We aimed to investigate the damage caused by Diabetes Mellitus (DM) in the testis structure in male rats with DM model and to investigate histochemical (Hematoxylin-Eosin, Masson Trichrom, Periodic Acid Schiff (PAS), immunohistochemical (Active Caspase-3 and TUNEL) and biochemical [malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx)] the effect of Ethyl Pyruvate (EP) in this damage.

Method: In the study, the experimental groups were arranged as follows.

Group 1. Control Group: No substance was applied, it has used for basal values. On the 18th day after starting the experiment all subjects were sacrificed and testicular tissue samples was taken.

Group 2. Ethyl pyruvate group: Subjects were given 50 mg / kg Ethyl pyruvate by intraperitoneal route twice daily from day 3 to day 18 of the experiment. They were sacrificed on the 18th day.

Group 3. Diabetes Group: Subjects were given a single dose of 45 mg / kg streptozocin (STZ) by i.p on the first day. They were sacrificed on the 18th day.

Group 4. Diabetes and Ethyl Pyruvate Group: The subjects were given a single dose of 45 mg / kg STZ on the first day by i.p. 50 mg / kg Ethyl pyruvate were given i.p. twice a day from the 3rd day of the experiment to the 18th day from the beginning of the experiment. They were sacrificed on the 18th day.

Hematoxylin-Eosin, Masson Trichrome, Periodic Acid Schiff immunohistochemistry in the right testis from subjects for histological examinations; TUNEL and Active Caspase-3 were done. GSH, GPx, MDA levels in the left testis from subjects were examined for biochemical assays.

Result:

During the histochemical examinations, normal testicular structure was observed in the control group. In the diabetes group; basal membrane thickening, basal membrane undulation, vacuolization in seminiferous tubules, germ cell loss and increased interstitial inland connective tissue growth were observed. Hematoxylin-Eosin, Masson Tricrom, PAS stainings and Johnsen scoring were performed on ethyl pyruvate and diabetic ethyl pyruvate groups, and testis structure was observed close to normal.

Immunohistochemically, TUNEL and caspase-3 staining were performed to determine positive cell activation in testicular tissue specimens. According to the control group, we found that the number of apoptotic cells in diabetic group was significantly increased. We observed a significant decrease in the number of apoptotic cells in the diabetic ethyl pyruvate group when comparing diabetic group with diabetic ethyl pyruvate group.

In the biochemical studies, GPx, GSH and MDA were evaluated. We found that MDA significantly increased in the diabetic group compared to the control group, while GSH and GPx decreased significantly. We have observed a significant reduction in the ethyl pyruvate and diabetic ethyl pyruvate groups when comparing the diabetes group with the ethyl pyruvate and diabetic ethyl pyruvate groups for MDA values. In addition, GSH and GPx values of ethyl pyruvate and diabetic ethyl pyruvate groups were significantly higher than diabetic group.

Conclusion:

In our study, we observed that the testicular tissue damage caused by STZ was reduced by ethyl pyruvate treatment.

Keywords:

Tip 1 DM: Tip 1 Diabetes Mellitus, EP: Ethyl Pyruvate, Testis, Rat

1. GİRİŞ VE AMAC

Diabetes Mellitus (DM), pankreasta beta (β) hücrelerinden salgılanan insülinin yetersizliği ve/veya dokularda insüline cevabın bozulmasıyla oluşur (1,2). Hayat boyu süren, sürekli gözlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları sebebiyle hastanın yaşam kalitesini oldukça düşüren ve topluma ekonomik yükü yüksek kronik metabolik bir hastalıktır (3,4).

DM; Tip 1 DM (insülin bağımlı DM), Tip 2 DM (insülin bağımlı olmayan DM), Gestasyonel DM ve Öteki tip DM'ler olmak üzere 4'e ayrılır (3). Bu tiplerden en çok Tip 1 ve Tip 2 DM rastlanmaktadır.

Tip 1 DM, pankreas beta hücrelerinin otoimmün hasarı sonucunda meydana gelmektedir. Tip 1 DM gelişen bireylerde, insülinin yokluğu ya da eksikliğinden dolayı insülin hormonunu dışardan verilmektedir. Bu sebepten İnsüline Bağımlı DM olarak da adlandırılmaktadır (5). Genellikle otoimmün kaynaklı β hücre yıkımı sonucu gelişen Tip 1 DM çoğunlukla prepuberte ve puberte dönemlerinde ortaya çıkar. Ancak yetişkinlerde de görüldüğü bilinmektedir (6). Çevresel faktörler ve genetik yatkınlık da etkilemektedir. Son yıllarda Tip1 DM hasta tanısı giderek daha erken yaşlara inmektedir ve hastalığın görülme sıklığı çok hızlı şekilde artmaktadır (7).

Normal fonksiyondaki hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) aksı, hipotalamustan Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınmasıyla hipofiz bezini etkiler ve hipofiz bezinden Luteinize edici Hormon (LH) ve Folikül Uyarıcı Hormonun (FSH) salgılanmasını sağlar. Bunun sonucunda da sertoli ve leydig hücreleri etkilenecek sertoli hücrelerinden Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) ve leydig hücrelerinden de testosteron salgılanır (8).

Tip 1 DM, HPG aksını hiperglisemi ile etkileyerek testosteron ve ABP'nin sekresyonunu azaltmaktadır, böylece fertil dönemdeki erkeklerde giderek artan oranlarda gözlenen cinsel ve aksesuar bez işlev bozukluğuna neden olmaktadır (7). HPG aksının düzenlenmesinde insülin seviyelerinin etkisi rol oynar. İnsülin, insülin reseptörleri (IRS proteini, PI3- kinaz) yoluyla sinyal yolağını etkiler. İnsülin reseptörlerinin insüline karşı hassasiyetini kaybetmesiyle oluşan hormonal değişiklikler ile testis dokusunu etkilemektedir ve spermatogeneziste önemli rol oynamaktadır (8).

DM’de düşük testosteron seviyeleri, testiküler disfonksiyon, yetersiz spermatogenez ve testiste apoptotik değişiklikler oluşturarak gonadal fonksiyonları etkiler. Bu etkiler deney hayvanlarında ve insanlarda gösterilmiştir (9,10). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, sperm morfolojisi, hareketliliği ve sayısında azalma, semen volümünde düşüş, HPG aksında hasar oluşmasıyla düşük hormon seviyeleri ve yüksek seviyede DNA hasarı gözlemlenmiştir (10). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda; DM’ye bağlı olarak testis dokusunda, tunika albuginea, interstisyel bağ dokusu, seminifer tübüller ve leydig hücrelerinde histolojik değişiklikler gözlenmiştir (4,9,11). Bunlar; seminifer tübüllerde çapın azalması ve atrofisi, sertoli hücrelerinde vakuol oluşumu, tunika albuginea ve fibröz dokuda kalınlaşma, spermatogenetik seri hücrelerinde kayıplardır (9,12,13).

DM hastalığının erken ve geç dönem (Glikozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi, protein glikasyonu ve AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) oluşumu, poliol yol) komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stres önemli rol oynamaktadır (14). Oksidatif stres tarafından uyarılan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, sitokrom C salınımı ve kaspaz aktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (15). Reaktif oksijen türevlerinin artması, DM testiküler işlev bozukluğunda önemli bir risk faktörüdür (4,11).

Pirüvat; 2-oxopropionat’ın genel adlandırılmasıdır. Pirüvat kinaz enzimi ile katalizlenen pirüvat, glikolitik yolağın son ürünüdür. Hücre içerisinde antioksidan fonksiyonu göstermektedir (16). Aynı zamanda artan metabolit yoluyla mitokondriyal biyogenezi sağlamaktadır. Önce trikarboksilik asit döngüsünün inhibitörü olan parapiruvat şekline dönüşür, daha sonra çok daha kararlı bir bileşik olan Etil Pirüvat (EP)’a dönüşmektedir (17). EP güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvarıdır (16). Bu etkileri, akut pankreatit, retinopati, diyabetik karaciğer hasarı gibi deneysel hayvan modellerinde gösterilmiştir (18,19).

2. GENEL BİLGİLER

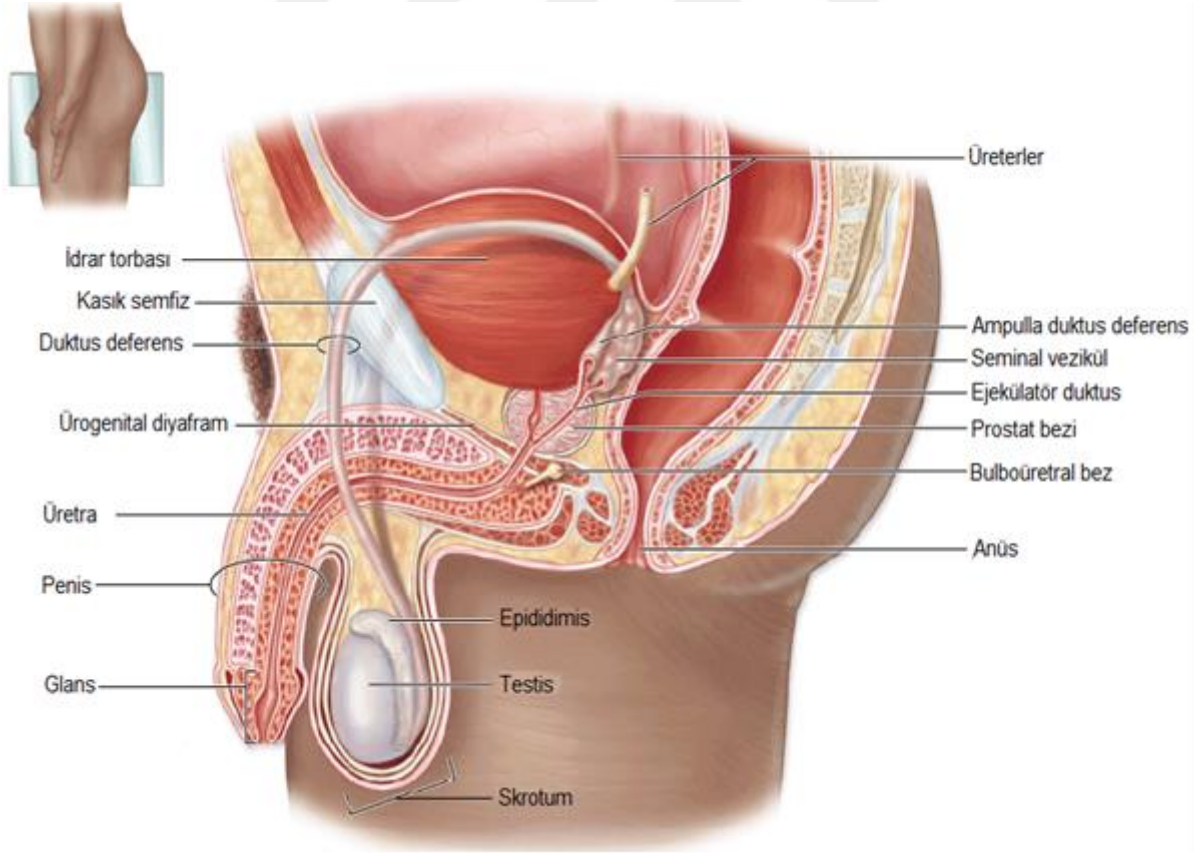
2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

2.1.1. Erkek Üreme Sistemine Genel Bir Bakış

Erkek genital sistemi, bir çift testis, genital boşaltma yolları, bu yollara açılan yardımcı bezler (veziküla seminalis, prostat ve bulboüretal bez) ve erkek dış genital organı penisten meydana gelir (20).

Testis, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere başlıca iki fonksiyona sahiptir. Başlıca testosteron olmak üzere androjenler, spermatogenez için gereklidir. Erkek embriyonun fenotipik erkek fetusa gelişiminde önemli rol oynarlar ve seksüel dimorfizmden sorumludurlar.

Erkek gametlerinin üretimi sırasında meydana gelen hücre bölünme olaylarında, dişideki ovumda olduğu gibi hem mitoz hem de redüksiyon bölünmesi olan mayoz gerçekleşmektedir (21).



Şekil 1: Erkek üreme sistemini gösteren şematik diyagram (22).

2.1.2. Erkek Genital Sisteminin Gelişimi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenir. Ancak her iki cinsiyete ait morfolojik karakteristik yapıları, intrauterin 7. haftaya kadar gelişimi gerçekleşmez. Embriyonel dönemin erken evrelerinde erkek ve dişi gonadlar benzerdir. Bu döneme seksüel gelişimin farklılaşmamış evresi denir (23,24).

2.1.3. Gonadların Gelişimi

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar;

1. **Ara Mezoderm**; Posteriyor abdominal kavitenin duvarındaki ürogenital kabartıları oluşturur. Miyoid hücrelerin ve Leydig (interstisyel hücreler) hücrelerinin kaynağıdır.
2. **Mezodermal Epitel**; Ürogenital kabartıların yüzeyini döşer ve ayrıca sertoli hücrelerinin kaynağını oluşturur.
3. **Primordiyal Germ Hücreleri**; Gelişmekte olan gonadlara yolk kesesinden göç edip, burada bölünerek spermatogonyumlara farklılaşırlar (21,24).

2.1.4. Farklanmamış Gonad

Gonad gelişimi ilk safhaları 5. haftada meydana gelir (24). Embriyolojik olarak erkek ve dişi gonadlar ürogenital (gonadal) kabartıdan meydana gelir (23). Bu kabartılar epitelin proliferasyonu ile beraber mezaşimal bağ dokusunun yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır. İntrauterin 6. Haftaya kadar gonadal kabartılar içinde germ hücreleri görülmez.

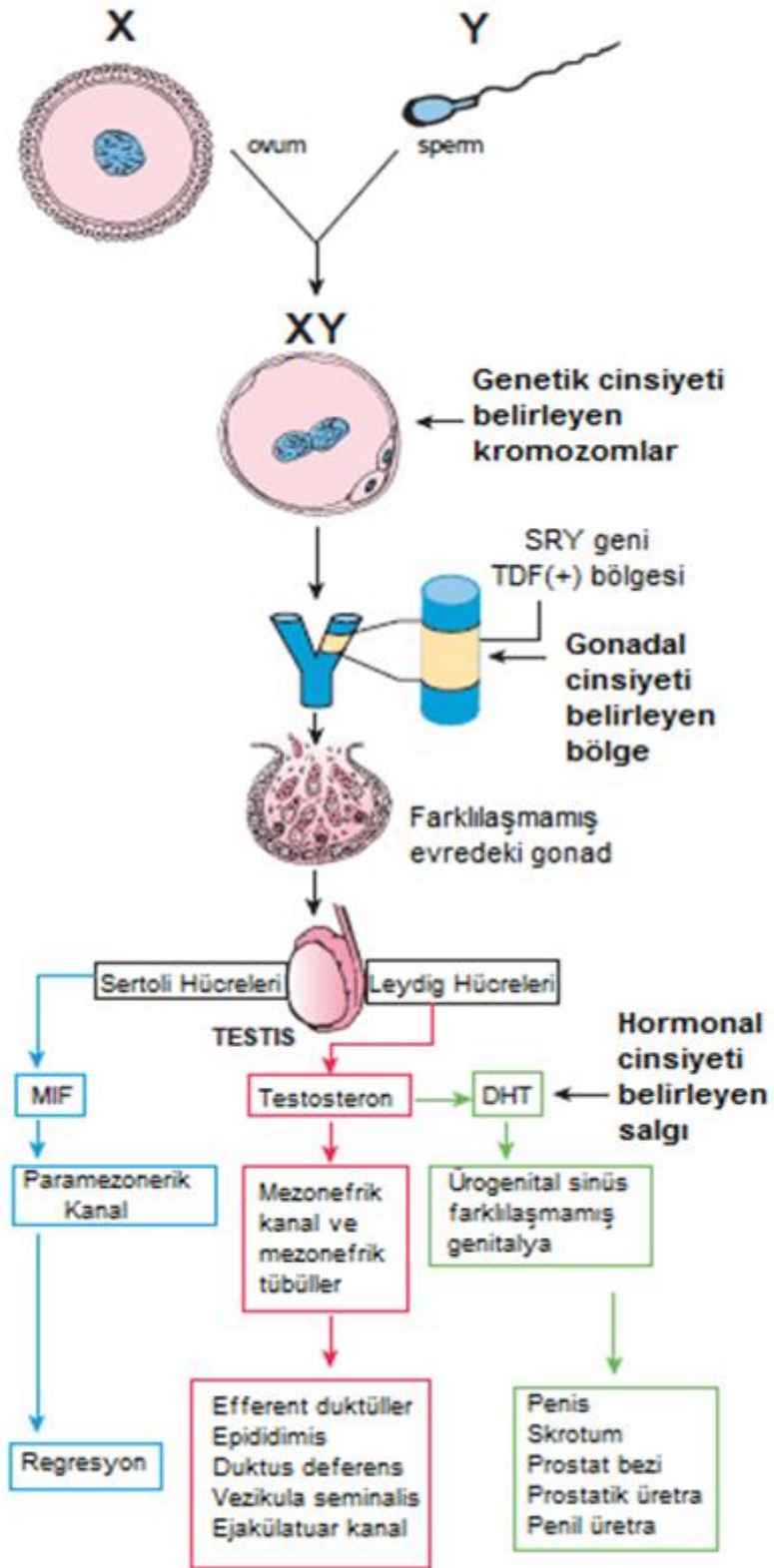
Epiblasttan köken alan primordiyal germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederek embriyonik dönemin 3. haftasında vitellüs kesesinin allantoise yakın komşuluğundaki endoderm hücrelerinin aralarına yerleşirler. 4. haftada ameboid hareketler ile ilerler. Son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek, 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşılır. 6. haftada genital kabartılara yerleşirler.

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmalarından önce ve ulaşmalarıyla eş zamanlı gonadal kabartıdaki epitel hücreleri proliferolurlar. Hemen altlarındaki mezaşimin içine gömülür, düzensiz kordonlar denilen **primitif cinsiyet kordonlarını** oluştururlar. Bu kordonlar her iki cinsiyet içinde embriyolarda yüzey epiteline bağlıdır ve birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. Bu evredeki gonada **farklanmamış gonad** denir. Söloomik epitelyal kordonlar, farklanmamış gonadın **dış korteks**

ve **iç medulla**_bölgelerini oluşturmak için, gonadal kabarıklığın mezenşimi içine doğru büyürler. Fetal gelişimin 7. haftasına kadar, her iki cinsiyet için genel tek bir gonad tipi vardır. Erkeklerde, korteks geriler ve medulla testisi oluşturur (25,26).

2.1.5. Cinsiyetin Belirlenmesi

Cinsiyetin farklılaşması bir gen aktivasyonları zinciri üzerinden gerçekleşmektedir. Fertilizasyon sırasında Y kromozomunun varlığına bağlı olarak genetik cinsiyet belli olur. Gonadal cinsiyet, Y kromozomunun kısa kolunda yer alan testis belirleyici faktörü (TBF) kodlayan SRY (Sex-determining Region on Y) geninin varlığıyla tayin edilir. Erken embriyonik gelişimde SRY geninin ekspresyonu cinsiyetin belirlenmesinden sorumludur (21,26). Testis gelişimi üzerinde en temel rolü oynayan SRY, bir transkripsiyon faktörüdür (26). SRY geni otozomal 9,11,17 ve 19 numaralı kromozomlarla ve X kromozomunda yer alan bazı gen dizilerinin aktivasyon zincirini kontrol eden bir ana şalter görevi görmektedir. SRY geniyle hemen hemen aynı zamanda eksprese edilen bazı genler de vardır. Bunlar; WT-1 geni, Sox-9 geni, SF-1 geni, DAX-1 geni'dir (21).



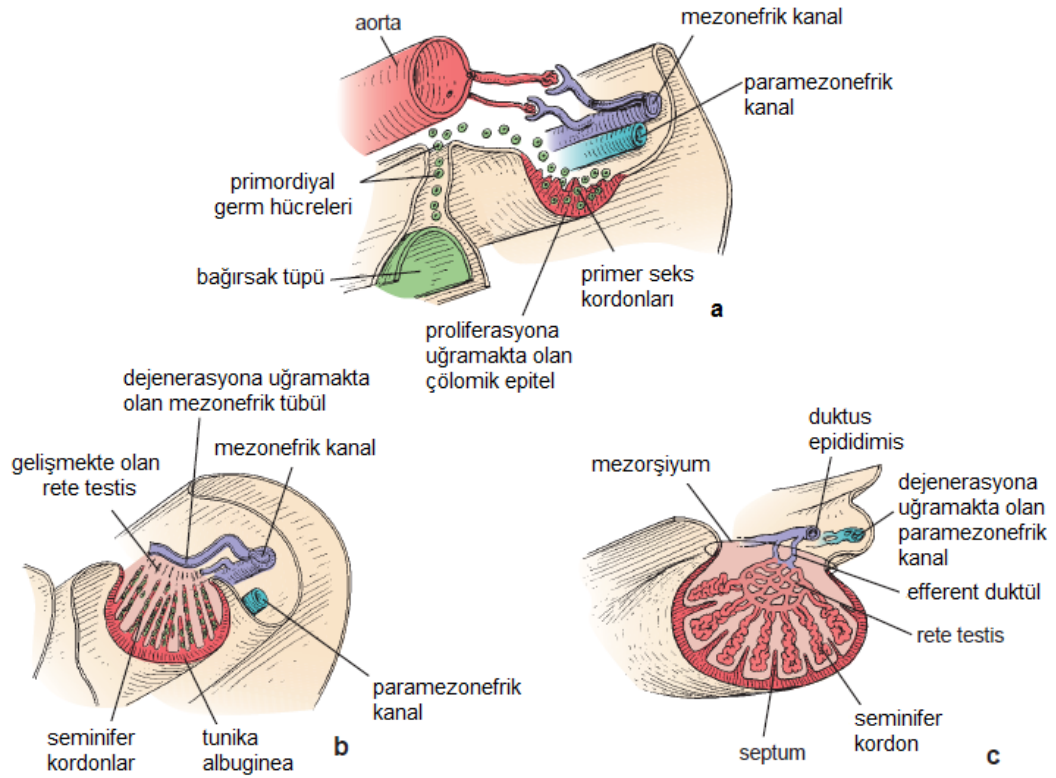
Şekil 2: Gelişmekte olan erkek cinsiyet üreme organları üzerindeki hormonal etkinin diyagramı(21).

2.1.6. Testislerin Gelişimi

Y kromozomunun kısa kolundaki TBF olan SRY geni, farklanmamış gonadın testis olarak gelişmesinde önemli bir fonksiyonu vardır. TBF, gonadal kordonları uyararak onların, farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasını sağlar (24). Bu süreçte XY seks kromozom kompleksine sahip embriyoda medulla testise farklanır, korteks ise gerileyerek dejenere olur. 12. haftada gelişmekte olan gonadın tunika albugineasının belirginleşmesi erkek fetus için karakteristiktir. Tunika albuginea tamamen gelişince yüzey epiteli ile bağlantısını kaybeder. Gelişen testis kademeli olarak mezonefrozdaki ayrıılır. Ayrılan testis kendi mezenterisi ile asılı hale geçer. Seminiferöz kordonlar, seminiferöz tübüller, intersitisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. 8. haftada Leydig hücreleri, androjenik hormonları üretmeye başlarlar. Androjenik hormonlar testosteron ve androstendiondur. Mezonefrik kanallar ve dış genital organların erkek cinsine uygun farklanmasını indüklerler. Testosteron yapımını insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu uyarır. 8-12 haftalar arasında testosteron düzeyi en yüksek düzeyine ulaşır. Leydig hücreleri işlevlerini intrauterin 18. haftaya kadar devam ettirirler. Testosteron sentezinde azalma ile birlikte gerilerler, prepubertal döneme kadar sessiz kalırlar (22-28).

Fetal gonadların işlev görmeye başlamasından önce, farklılaşmamış üreme kanalı, Wolff kanalları ve Müller Kanalları (paramezonefrik kanal) denilen çift genital kanal sisteminden oluşur ve genital kanal ve idrar sisteminin dışarıya açıldığı ortak bir kanal vardır. Erkekte Wolff kanalı kalmaya devam ederken Müller kanalı geriler. İki kanal sisteminden hangisinin ve hangi tip dış genitalin gelişeceği fetal testisin varlığı veya yokluğuna bağlıdır. Bu testisler testosteron ve Mülleriyen-inhibe edici madde (MIS) veya antimüllerian hormon (AMH) denilen bir protein hormonu salgılar.

SRY proteini MIS genini indükler, MIS ise Müller kanal sisteminin gerilemesine neden olur. Testosteron; eşzamanlı olarak Wolff kanallarının, epididim, vaz deferens, ejakülatör kanallar ve seminal veziküllere farklılaşmasını sağlar. Daha sonra ve esas olarak hedef dokuda testosterondan üretilen dihidrotestosteronun (DHT) etkisi altında bir penis oluşur ve doku skrotumu yapmak üzere kaynaşır. Testisler en sonunda skrotuma iner. Bu iniş testosteron tarafından uyarılır (21,23,24).



Şekil 3: Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı. **a)** Bu diyagram 5 haftalık bir embriyoda farklaşmamış gonad evresini göstermektedir. **b)** Testis belirleyici faktörün etkisi altındaki gonadın testosteron üretimi, primer seks kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşmasını göstermektedir. **c)** Testiküler gelişimin son evresidir (21).

2.1.7. Testis Anatomisi

Testisler, funiculus spermaticus'a asılı olarak skrotum içine yerleşmiş, spermatozoonlar ile androjenleri üreten bir çift erkek üreme organıdır. Skrotum deneni deri kesesi içinde bulunur. Skrotumun iç yüzü septum scroti ile iki bölüme ayrılır.

Testisler elips şeklinde olup, yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2.5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 gr ağırlığındadır. Sol testis sağ testise göre 1 cm daha aşağıda yer almaktadır. Testislerin skrotumda duruşları vertikal olmayıp, organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik pozisyonundadır.

Testisin **facies medialis** ve **facies lateralis** olmak üzere iki yüzü, **margo anterior** ve **margo posterior** iki kenarı; **extremitas superior** ve **extremitas inferior** olarak iki ucu vardır. Margo anterior peritoneum viscerale'nin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo

posteriorun medial bölümünde corpus epididymis oturur. Margo posteriorun orta kısmında testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur. Extremitas superior üst uç olup caput epididymis yerleşmiştir. Extremitas inferior testisin alt ucu olup cauda epididymis ile örtülüdür (29-33).

Testisler intrauterin dönemde karın boşluğu içinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişir. Doğumdan önce, canalis inguinalis'ten geçerek skrotum içine iner. Fetal gelişimin daha sonraki dönemlerinde peritonun parmak şeklinde bir çıkıntısı olan processus vaginalis, gubernaculum testisi izleyerek karın ön duvarından geçer ve skrotuma ulaşır. Böylece processus vaginalis, testislerin karın boşluğundan skrotuma inişine öncülük eder. Processus vaginalis, iniş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürükler. Normal durumda testisler doğumdan hemen önce bu yolu takip ederek canalis inguinalisten geçer ve skrotumla iner. Processus vaginalis ise doğumdan kısa bir süre sonra kapanır ve testisin etrafında processus vaginalis kalıntısı olan bir tabaka kalır. Bu tabakaya da **tunica vaginalis testis** adı verilir.

Tunica 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, funiculus spermaticus'un ön ve iç tarafını da kaplayacak biçimde uzanır. İki lamina arasında bir boşluk oluşur. Ayrıca bu boşlukta az miktar da seröz sıvı bulunur.

Tunica vaginalis testisin iç tarafında da, testisleri saran iki tabaka daha vardır. Bunlar tunika vaginalis testisten içe doğru tunika albuginea ve tunika vaskülozadır.

Tunica 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 ductuli efferentes testis olarak isimlendirilen kanallar aracılığıyla epididimise gelir.

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

Arterleri: A. abdominalisin dalı olan a. testicularis sinistra ve dextra

Venleri: Testisin arkasından çıkan küçük venler birleşir. Plexus pampiniformis olarak adlandırılan venöz ağımeydana getiriler. Plexus pampiniformis, funiculus spermaticus içinde yükselir ve canalis inguinalisten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Plexus pampiniformisi oluşturan venler daha üst kısımda birleşme yaparak v. testicularisi oluşturur. V. testicularis dextra, v. cava inferiora, v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistraya direne olur.

Lenfatikleri: Yüzeyel lenf damarları tunika vaginalis testisin altında, derin lenf damarları testis ve epididimisin içinde yer alır. Bu damarlar funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna geçer, sonuçta nodi aortici laterales ve nodi preaortici'ye açılır.

Sinirleri: Testisleri innerve eden sinirler medulla spinalisin 10-11. torakal segmentlerinden gelir. Bu sinirler plexus aorticus ve plexus renalis içinden geçer ve testisleri besleyen damarlar ile birlikte organa ulaşır (33).

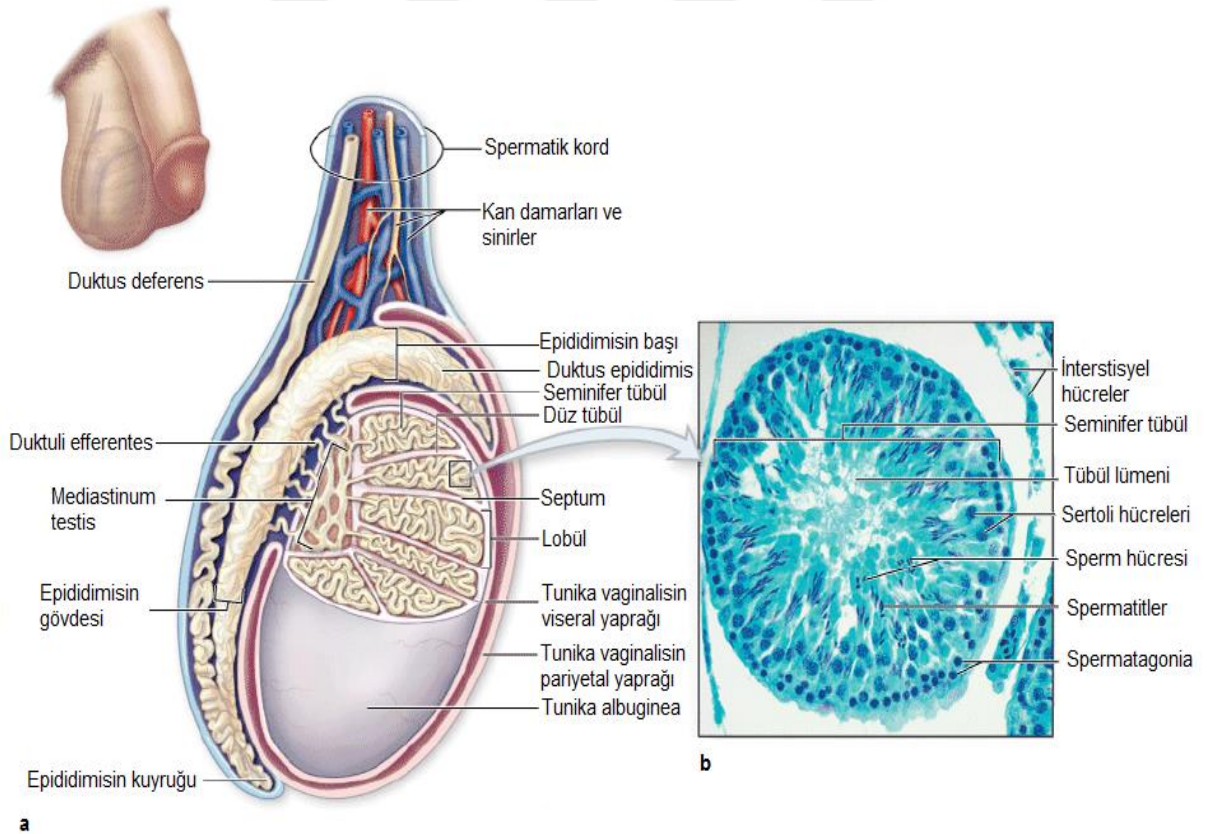
2.1.8. Testis Histolojisi

Testis, ekzokrin ve endokrin özelliğe sahiptir. Bileşik tübüler yapıdadır. Testisin ekzokrin ürünü seminifer tübüllerde oluşturulan spermatozoonlardır, endokrin ürünü ise Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosterondur (34).

Normal spermatogenez için 34-35°C gereklidir. Testislerin karın boşluğunun dışında yerleşimi vücut sıcaklığından 2-3°C düşük olmalarını sağlar. (25). Skrotumun altında her bir testis kapsül ile sarılı haldedir. Bu yapıya **testiküler kapsül** denmektedir. Testiküler kapsül 3 tabakalı bir yapı göstermektedir. Bu tabakalar içerden dışarıya doğru, tunika vasküloza, tunika albuginea ve tunika vaginalis'dir (35).

Testisin arka yüzü boyunca kalınlaşan Tunika albuginea'ya, **mediastinum testis** denilmektedir. Bezin içine giren fibröz septumlar organı testiküler lobüller denilen yaklaşık 200-250 tane piramidal bölmeye ayırırlar. Bu septumlar tam değildir, lobüller arasında çoğu yerde birbirleriyle iletişim halindedirler. Apikal kısımları mediastinuma doğrudur. Lobüllerin hacmi bulundukları yere göre değişmektedir. Ortada bulunanlar büyük ve uzundur. Her lobülde gevşek bağ dokusuyla sarılı halde 1-4 kadar sayıda, aşırı kıvrımlı tübüller yapıları olan seminifer tübüller bulunur. Bu bağ dokusunda bol miktarda Leydig hücreleri, sinirler ile kan ve lenf damarları yer alır.

Genital kanallar ve yardımcı bezlerden üretilen salgılar, sperm ile karışarak **semen** karışımını oluştururlar. Semen, spermilerin beslenmesini ve spermilerin sıvı bir ortam içerisinde taşınmasını sağlar. Ayrıca, erkek üretrası ve vajinal kanalın asiditesini nötralize eder (22,36,37).



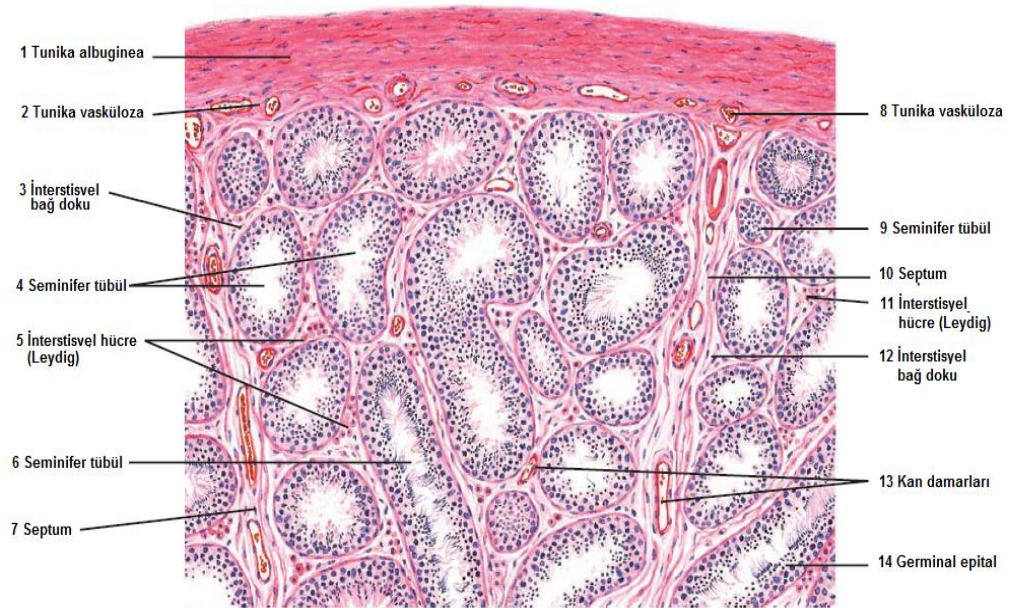
Şekil 4: Testis ve seminifer tübül şematik diyagramları. **a.** İnsan testisinin sagittal kesiti, **b.** Seminifer tübül (22).

2.1.8.1. Seminifer Tübül Histolojisi

Seminifer tübüllerin her biri yaklaşık olarak 30-70 cm uzunlukta ve 150-250 µm çapındadır. Testisin %92'sini oluşturur. Seminifer tübül epiteli, iki hücre grubu barındıran karmaşık yapıya sahip çok katlı bir epitelidir. Bir testisteki seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır. Bu tübüller kıvrımlı bir ağ yapısındadırlar. Başlangıçta kör uçludurlar ve dallara ayrılır. Her bir tübül sonlanırken lümeni daralır ve **düz tübül** ya da **tubuli rekti** denen kısa parçaları oluşturur. Tubuli rektler, seminifer tübüllerin **rete testise** bağlanmasını sağlarlar. Rete testis de 10-20 **duktuli efferentes** ile **epididimisin** baş kısmına bağlanır.

Seminifer tübüllerin dışında bağ dokusu kılıfı bulunur. Bu kılıf fibröz yapıdadır. Kollajen lifler, fibroblastlar ve **miyoid hücreler** bulunur. Miyoid hücreler henüz hareket yeteneği kazanmamış spermeleri rete testise ilerlemesini sağlayan ritmik kasılmalardan sorumludur. Spermeler epididimde hareket özelliği kazanırlar.

Seminifer tübül epiteli belirgin bir bazal laminaya sahiptir. Çok katlı özelliğe sahiptir. Epitel iki tip hücreden oluşur. Bu hücreler; Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri. Spermatogenik seri hücreleri 4-8 tabaka halinde, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde bulunmaktadırlar. Bu hücreler birkaç bölünme geçirdikten sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. (21,22,25,36)



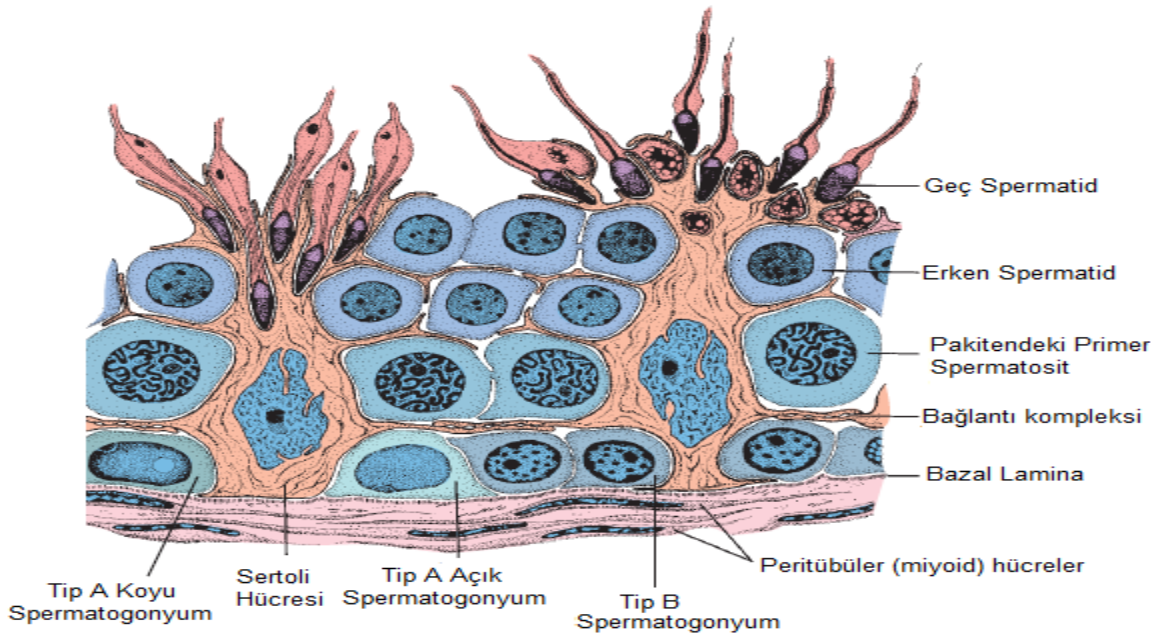
Şekil 5: Testisin perifer kesit (kısmi görüntüsü) şematik diyagramı. Boya; hematoksilin-eozin (37).

2.1.8.1.1. Sertoli Hücreleri

Puberteye kadar seminifer epitelde esas hücre tipi sertoli hücreleridir. Puberteden sonra, epitel hücrelerinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. İleri yaşlardaki bireylerde spermatogenik hücre serisinin oranı düşer, sertoli hücreleri tekrar esas hücre tipi haline gelmektedir.

Sertoli hücreleri testiküler tübülleri oluşturan germinal epitel kaynaklıdır. Spermatogonyum dışındaki bütün germ hücrelerini bazal membrandan ayıran, bazal membrana oturmuş ve bazal membrandan seminifer tübül lümenine doğru uzanan büyük hacimli prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral hücre membranları düzensiz hücre sınırları şeklindedir. Bu düzensiz sınırları ile germ hücreleri arasına girerek onları sararlar. Seminifer tübül lümeni ve tübüller arasındaki boşlukta bağlantıyı sağlayan hücreler olarak görev yaparlar.

Sertoli hücreleri büyük bazale yerleşmiş bir çekirdeğe sahiptirler. Heterokromatin özellikteki çekirdek ve geniş bir çekirdekçiğe sahiptir. Sitoplazmada mitokondriyonlar, lizozomlar, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları, yaygın golgi ve vimentin, aktin, mikrotübüller içeren zengin bir hücre iskeleti bulunur. Mitokondrileri değişik büyüklükte ve şekilde olabilir. Ayrıca 8 köşeli **charcot- börttcher kristalleri** ile uzun yapılı **sprango kristalleri** karakteristiktir.



Şekil 6: Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri şematik diyagramı (21).

Sertoli hücreleri seminifer tübül epitelini sertoli-sertoli bağlantı kompleksi altında (tight junction, occluding junction) bir çizgide 2 bölüme ayırır. Bunlar; **bazal kompartman** ve **apikal (adluminal) kompartman**'dır. Bazal bölümde spermatogonyum ve erken spermatosit-I, apikal bölümde ise spermatosit-II ve spermatidler bulunur. Gelişim sürecinde spermatit haline geçen spermatogonyumların bu sınırı nasıl geçtikleri henüz bilinmemektedir (25,36).

Olgun testiste bölünme göstermeyen sertoli hücreleri birçok etkenlere karşı oldukça dayanıklıdır (ısı, radyasyon, toksik madde, enfeksiyon gibi) (28,34,37). Sertoli-sertoli hücre bağlantı kompleksi **kan-testis bariyeri** olarak adlandırılan bir geçirgenlik bariyerini de oluşturmaktadır. Bu bariyer seminifer epitelden iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu bakımından fizyolojik bir kompartmanlaşmanın oluşturulması için gereklidir. Bu nedenle, seminifer tübüllerdeki ve boşaltım kanallarındaki sıvının kompozisyonu testiküler lenften ve kan plazmasından oldukça farklılık göstermektedir.

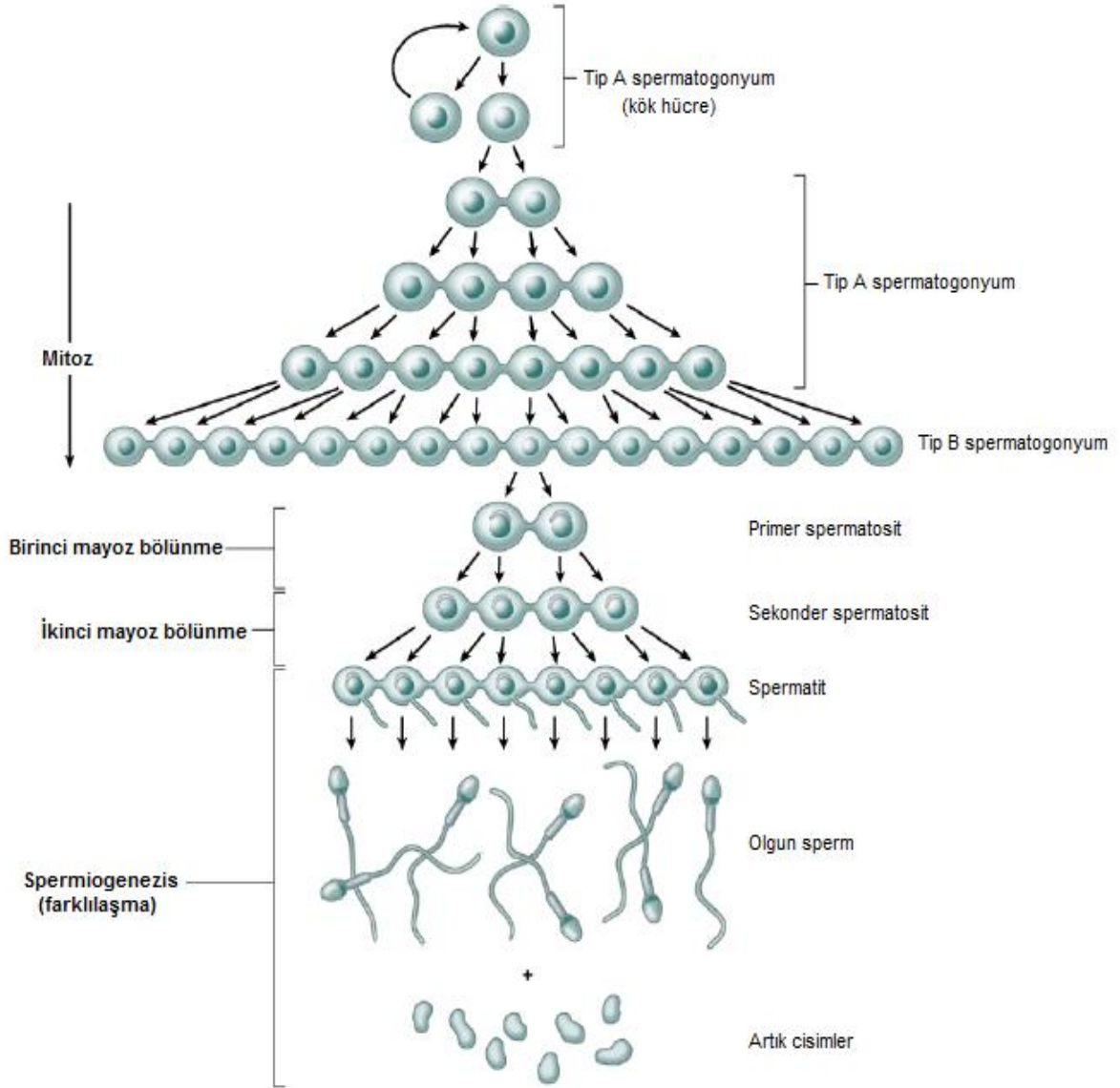
Testis kapillerleri pencerelidir. Fizyolojik ve morfolojik çalışmalar sertoli-sertoli bağlantı komplekslerinin bir kan-doku bariyeri oluşturduğunu göstermiştir. Kan-doku bariyerleri, beyin, testis, timüs gibi çok az bazı dokularda bulunmaktadır. Buradaki amaç immün sistemin etkisinden, yabancı hücre olarak kabul edilen spermi korumaktır (21,36).

Sertoli hücrelerinin başlıca görevleri;

1. Spermatogenetik hücrelere fiziksel dayanak sağlar
2. Spermatogenetik hücrelere gerekli metabolit, steroit ve besinleri sağlar
3. Dış ortamdan seminifer tübüllere bazı maddelerin geçişini önler (kan-testis bariyeri)
4. Androjen taşıyıcı olan TBG (testosteron binding globülin) salgılar
5. Dejenere spermatidleri ve residual bodyleri fagosit eder
6. Salgıladıkları bazı maddeler ile bölgedeki mitozu ve mayozu kontrol eder. İnhibin salgılayarak (hipofiz denetlemek üzere) FSH salgılanmasını inhibe eder ve Leydig hücre fonksiyonunu, hipofiz gonadotropinlerini denetler
7. Spermatogenetik hücreleri seminifer tübüllere salgılar. İçinde filamentlerde aktin bulunmaktadır. FSH etkisindedirler.
8. Anti-Müllerian hormon salgılar. Bu hormon embriyoda Müller kanalının regresyonunu önleyen gliko-protein yapıdadır (34,36).

2.1.8.1.2. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinde çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan ve düzenli olarak bölünerek olgun spermilere farklanan 4-8 tabakalı hücrelerdir. Bazaldan lümene doğru hücre tipleri sırası ile; spermatogonyumlar (tip A ve tip B), primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlardır (34).



Şekil 7: Spermatogenetik seri hücrelerinin bölünme ve farklılaşmasını gösteren şematik diyagram (22).

Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar bazal kompartmana yerleşik diploid sayıda kromozom içeren spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki zonula okludenslerin altında yerleşim gösterirler, böylelikle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar.

Puberte başlayana kadar, spermatogenetik hücrelerden sadece spermatogonyumlar bulunur. Pubertede hormonal etki ile spermatogonyumlar mitozla çoğalarak diğer tip hücreleri oluşturur. Spermatogonyum kendisinden gelişen hücre tiplerine göre daha küçüktür. Çekirdeğin büyüklüğü, biçimi, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre 2 tipe ayrılır ve her çekirdek 46 kromozomludur (diploid);

- **Tip A Spermatogonyum** (insan testisinde **A koyu** ve **A açık** spermatogonyumlar olarak gözlenir): Çekirdeği ovaldir. Mitozla bölününce yarısı tip A olarak kalır, yarısı büyüyerek tip B'ye dönüşür.
- **Tip B Spermatogonyum**: Ana spermatogonyumlardan daha büyük hücrelerdir. Çekirdeği çok yuvarlaktır ve koyu boyanır. Tip B'nin mitozla çoğalması ile oluşan hücrelerin hepsi farklılanarak **primer spermatosit'i** (spermatosit-I) yapar. Primer spermatosit bazal laminadan uzaklaşır ve hacmi artar (25,34).

Primer Spermatosit (Spermatosit-I)

Seminifer epitelin orta bölümünde bulunan, küre ya da oval biçimli, hacmi en büyük olan hücrelerdir. Oluşur oluşmaz 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Profaz evresi çok uzun sürdüğü için çok sayıda gözlenmektedirler. 46 kromozom (diploid) taşırlar.

Sekonder spermatosit (Spermatosit-II)

Primer spermatositin mayoz bölünmesi sonucu oluşan 23 kromozomlu (haploid) küçük hücrelerdir. Spermatosit-II'ler birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlıdırlar. Hemen kısa sürede 2. mayoz bölünmeye uğradıklarından, kesitlerde görülmeleri çok zordur. Bölünmesiyle **spermatid**'ler oluşur.

Spermatid

23 kromozom taşırlar. Spermatosit-II'nin yarısı kadar büyüklükte dirler. Birbirleriyle sitoplazmik bağlantı yapan sinsityal hücre kümesi oluşturlar.

Primer, sekonder spermatosit ve spermatidlerin aralarındaki sitoplazmik köprüler spermatogenezisin düzenlenişinde rol oynar, hücreden hücreye bilgi aktarılmasına olanak sağlar. Spermatogenezis tamamlanınca bu köprüler kaybolur ve hücreler serbestleşir. Spermatid bölünmez, şekil değiştirerek spermiyuma dönüşür. Böylece spermatogonyumdan spermiyum oluşana kadar 2 evre bulunur;

- **Spermatositogenezis:** Spermatogonyumdan spermatid oluşması
- **Spermiogenezis:** Spermatidin şekil değiştirerek spermiyumu oluşturm asıdır (21,25,34).

Spermatositogenezis;

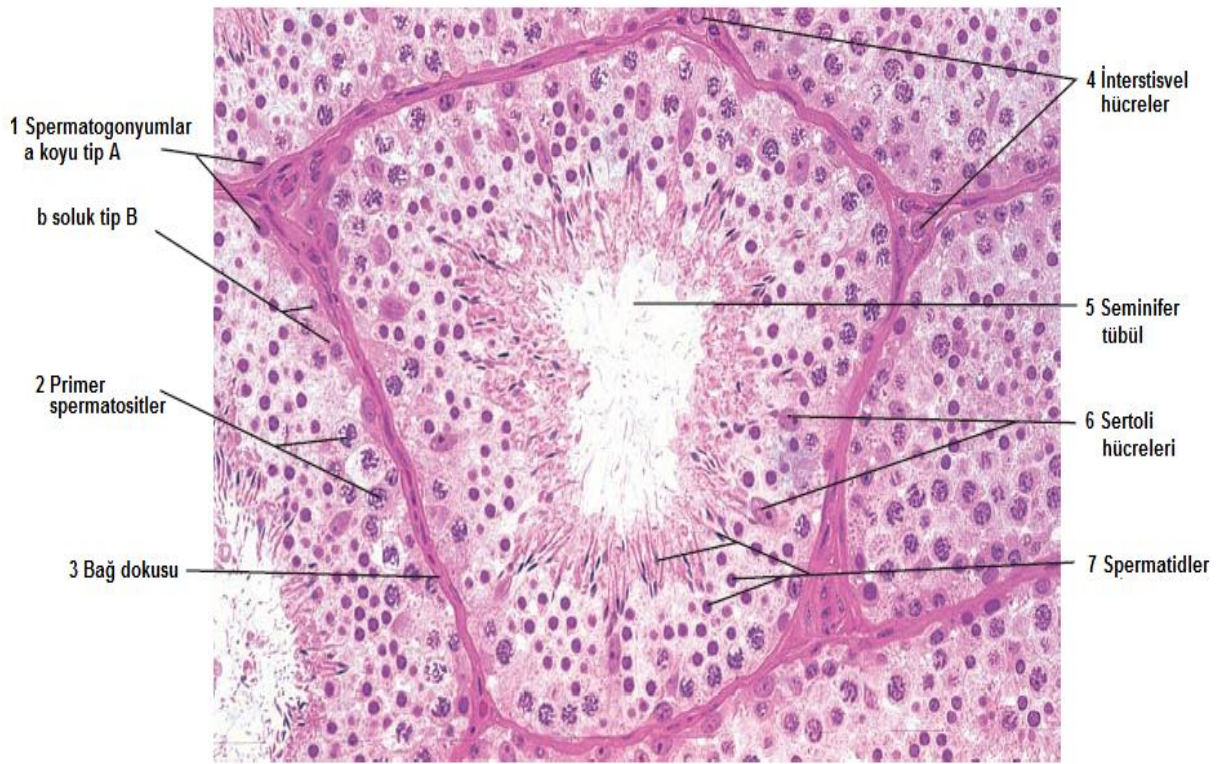
Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatositleri üretir. Primer spermatositler, diploid kromozom sayısına ve $2n$ DNA miktarına sahiptirler. Mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler. Böylece, her primer spermatosit iki katı miktarda DNA ($4d$) ve normal sayıda kromozom ($2n$) içerir.

Mayoz I, kromozom sayısını azaltır ve DNA miktarını haploid duruma getirir. Böylece sekonder spermatosit, haploid kromozom sayısı ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA ile karakterizedir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmaz, bu bölünmeden sonra her bir spermatid haploid ($1n$) sayıda kromozoma sahiptir ve her bir kromozom tek bir kromatid içerir.

Dört kromatidden oluştukları için tetrad adı verilen homolog kromozom çiftleri, crossing-over olarak adlandırılan süreç ile genetik materyal değişimi yaparlar. Genetik değişim yoluyla, her spermatositin ürettiği dört spermatid birbirinden ve diğer spermatidlerden farklı olur. Gen değişimi tamamlandıktan sonra homolog kromozomlar ayrılır ve mayoz mekiğinin zıt kutuplarına göç ederler.

Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler, sekonder spermatositler olarak isimlendirilmektedir. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Sekonder spermatosit diploid DNA miktarına (2d) sahiptir.

İkinci mayotik bölünmenin metafaz evresinde, kromozomlar metafaz plağında dizilirler. Kardeş kromatidler birbirlerinden ayrılır ve zıt kutuplara hareket ederler. MayozII bittiğinde ve nüklear membranlar tekrar oluştuğunda her bir sekonder spermatositten iki haploid spermatid oluşur. Bu spermatidler 23 kromozom (1n) ve 1d miktarında DNA içerirler (20,21).



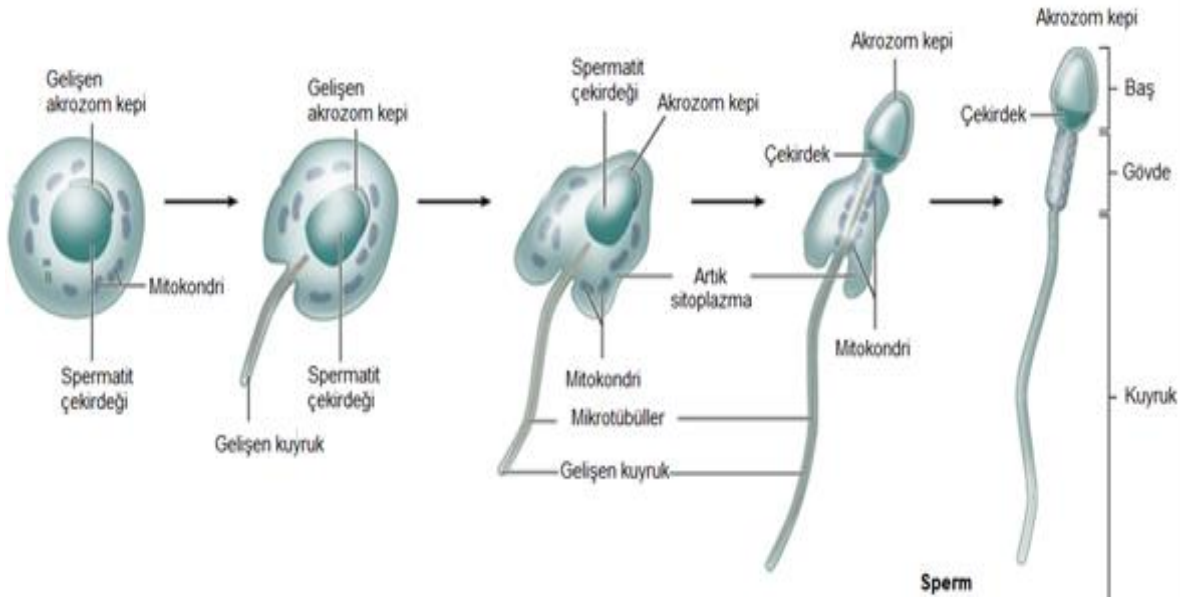
Şekil 8: Gelişimlerinin farklı evrelerindeki spermatogonyumlar ve spermatidleri gösteren seminifer tübüllerin enine kesiti. Hematoksilen-eozin boyaması şematik diyagramı (37).

Spermiogenezis;

Spermatidler olgun sperme farklılaşırken yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye uğrarlar. İkinci mayotik bölünmenin sonucunda oluşan her spermatit DNA içeriği olarak haploiddir (1d) ve (1n) olan kromozom sayısı 22 otozom ve bir X ya da Y kromozomu tarafından temsil edilmektedir. Daha fazla bölünme olmaz. Haploid spermatidler, olgun spermatidi oluşturan bir farklılaşma sürecine uğrarlar.

Spermatid popülasyonunun olgun sperme farklılaşması dört fazdan oluşmaktadır. Bunlar;

- **Golgi fazı**
- **Kep fazı**
- **Akrozom fazı**
- **Olgunlaşma fazı** 'dır (21).



Şekil 9: Spermiogenezis şematik diyagramı (22).

Golgi fazı;

Bu faz spermatidin çok sayıdaki golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granüllerin bulunması karakteristiktir. Bu proakrozomal granüller, glikoprotein bakımından zengindirler ve akrozomal vezikül denen ve nüklear zarfa komşu, membranla sınırlandırılmış bir vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün pozisyonu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Bu fazda, sentriyoller de jukstanükleer bölgeden spermatidin arka kutbuna doğru göç ederler. Arka kutupta olgun sentriyol plazma membranına dik açı ile hizalanırlar. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübül parçalarının bir araya gelmesiyle başlatır.

Kep fazı;

Bu fazda akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerinde yayılır. Bu yeniden şekillenmiş yapıya **akrozomal kep** denmektedir. Akrozomal kepin altındaki nüklear zarf parçası porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nüklear içerikte yoğunlaşır.

Akrozom fazı;

Bu fazda spermatit kendini yeniden hizalar ve baş, sertoli hücresinin içerisine iyice gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Flagellum gelişmeye başlayarak seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu uzayıp yassılaşır Çekirdek ve akrozom da plazma membranının ön kısmına hemen komşu bir pozisyona taşınır ve sitoplazma posteriyora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere organize olurlar.

Önceden flagellumun gelişimini başlatmış olan sentriyoller çekirdeğin arka yüzeyine taşınırlar. Burada immatür sentriyol nükleustaki sığ bir oluğa tutunur. Daha sonra sentriyoller, gelişmekte olan spermin bağlantı parçasını ya da boyun bölgesini oluşturmak üzere farklılaşırlar. Nükleusa tutunan sentriyollerden dokuz kalın fibril gelişir ve aksonemin mikrotübüllerinin periferinde bulunan dış yoğun fiberler olarak kuyruğun içine doğru uzanır. Bu fiberler çekirdeği flagellum ile birleştirirler ve bu nedenle bu bölgeye bağlantı parçası denmektedir.

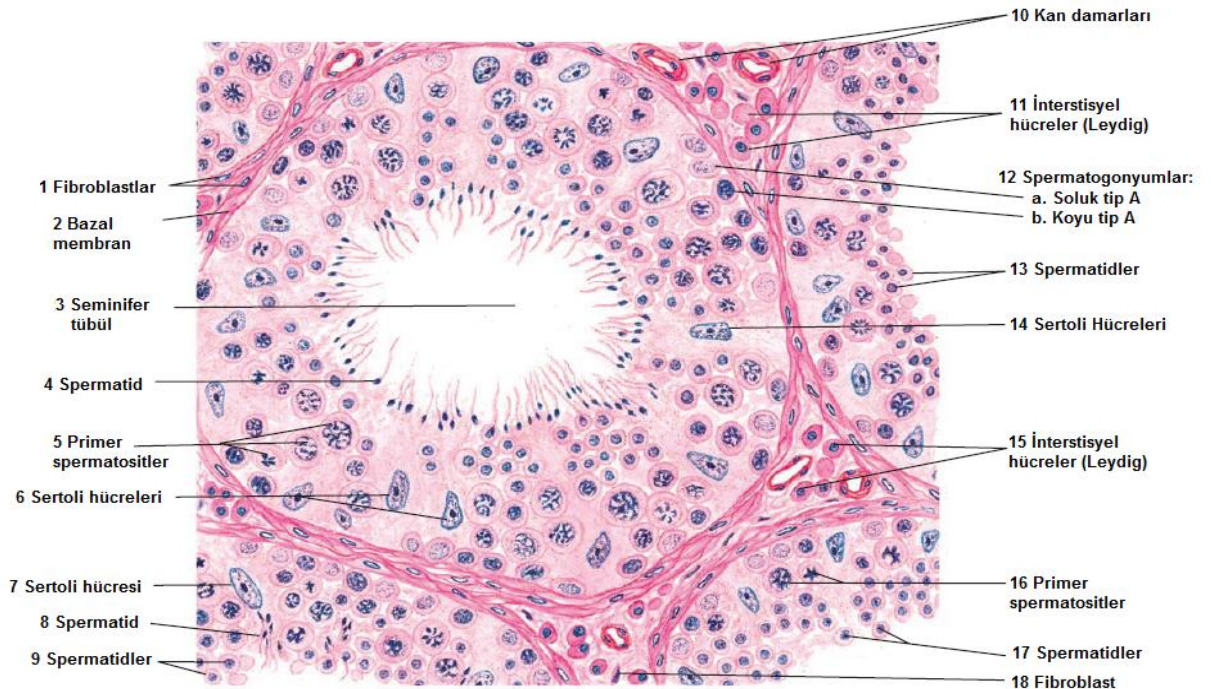
Plazma membranı gelişmekte olan flagellumu çevrelemek üzere arkaya doğru hareket ederken, manşet kaybolur ve mitokondriler, boyun bölgesindeki kaba fibrillerin etrafında ve boyun bölgesinin hemen posteriyor uzantısında sıkı, heliks tarzında saran bir kılıf oluşturmak üzere sitoplazmanın kalan kısmından göç ederler. Bu bölge, spermin kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinde uzunlamasına iki sütundan ve çok sayıda bağlantı kuşağından oluşan bir fibröz kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal fiberini çevreler ve flagellumun neredeyse ucuna kadar uzanır. Kuyruğun, fibröz kılıfın distalinde kalan bu kısa segmenti son parça olarak adlandırılmaktadır.

Olgunlaşma fazı;

Son faz olan olgunlaşma fazında flagellanın çevresindeki fazla sitoplazma atılır ve olgun spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik olarak da adlandırılan fazla sitoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosit edilerek ortadan kaldırılır. Hücreler arası köprüler rezidüel cisimlerde kaldıklarından spermatidlerin birbirleriyle bağlantıları kalmaz ve sertoli hücrelerinden salıverilirler (21).

İnterstisyel Doku

Seminifer tübüller arasında bağ doku, sinirler, kan ve lenfatik damarlar bulunur. Burada bulunan kapillerler pencereli tiptedir ve makromoleküllerin (kan proteinleri gibi) geçmesine müsaade ederler. Bağ dokusunda fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Pubertae döneminde ek bir hücre tipi belirgin hale gelir. Bunlar interstisyel hücre ya da diğer adıyla Leydig hücreleridir (22).



Şekil 10: Seminifer tübül ve interstisyel aralık (enine kesit), Hematoksilen-eozin boyama şematik diyagramı (37).

Leydig Hücreleri;

Leydig hücreleri erken fetal hayatta gelişen testiste çok sayıda bulunmaktadır. Placenta kökenli gonadotropinlerin kan yoluyla fetal testise ulaşır, leydig hücrelerini uyarması sonucu leydig hücreleri hormon üretmeye başlar. Sentezledikleri testosteron erkek genital organların embriyolojik farklılaşmasında etkindir. Gebeliğin 4-5 ayına kadar leydig hücreleri tam gelişmiştir. Daha sonra dejenerasyona uğrarlar, dolayısı ile testosteron seviyesi düşer. Pubertede hipofizden salgılanan luteotropik hormonunun (LTH) uyarmasıyla yeniden leydig hücreleri görülmeye başlar. Serumda bulunan testosteronun %95'i leydig hücreleri tarafından salgılanır. Leydig hücre toplulukları, kan damarları ve lenfatik kanal veya sinüzoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir. Leydig hücreleri insanda testis hacminin %12'sini oluşturmaktadır. Tek ya da gruplar halinde, sıklıkla üçgen biçimli kümeler şeklinde, bazen kan damarının yakınında bulunurlar.

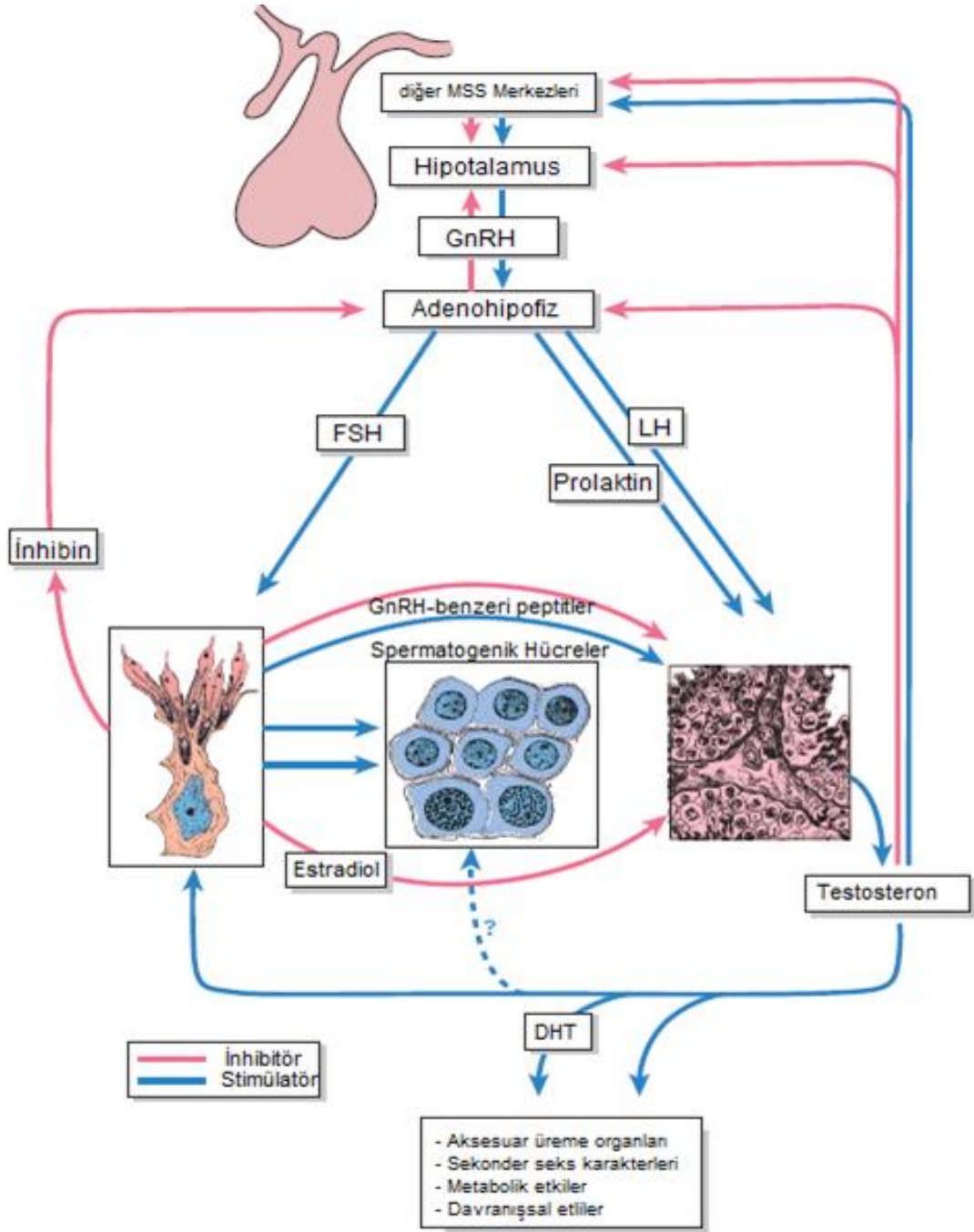
Büyük oval çekirdeği çoğunlukla eksentriktir. Birçok steroid-üreten hücre gibi, leydig hücreleri lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristali mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş bir düz endoplazmik retikulum içerir (25,34).

2.2.HİPOTALAMO-HİPOFİZ-GONAD AKSI

Üreme işlevi büyük ölçüde bir hormon zinciri tarafından denetlenir. Zincirindeki ilk hormon gonadotropin salıcı hormondur (GnRH). GnRH, ön hipofiz bezi işlevinin denetimine katılan hormonlardan bir tanesidir. Bu hormon hipotalamustaki nöroendokrin hücreler tarafından salgılanır ve hipotalamo-hipofizer portal kan damarları ile ön hipofiz bezine erişir. GnRH ön hipofiz bezinde, hipofizer gonadotropinlerin, yani follikül uyarıcı hormon (FSH) ile luteinleştirici (LH) salınmasını uyarmakta olup bunlar da üremenin birincil düzenleyicileridir. Bu iki hormon gonadlara etki etmektedir. LH spermatogenezisi dolaylı olarak uyarır. Endojen testosteron üretimini de aktive eder. FSH ise spesifik reseptörleri olan Sertoli hücreleri üzerinde etkilidir. Bundan dolayı testosteron ve FSH, seminifer tübül epiteline etki eder. Testosteron üretildikleri gonadlar dahil üreme sisteminin bütün bölümleri ve vücudun diğer bölümleri üzerinde birçok etki göstermektedir.

Gonadal steroidler GnRH, FSH ve LH salgılanması üzerine negatif feedback etkilidir. Gonadal steroidlerin, hem doğrudan ve hem GnRH nöronlarından girdiler alan hipotalamustaki kisspeptin nöron hücre gövdelerini inhibe ederek dolaylı yolla GnRH üzerine negatif feedback

uyguladığı düşünülmektedir. İnhibin gibi gonadal protein hormonlar da ön hipofiz bezi üzerine feedback etkilerine sahiptir (21,23,38,39)



Şekil 11: Erkek üreme fonksiyonunun hormonal düzenlenişi gösteren diyagram. Mavi oklar sistemdeki stimulator etkiyi, kırmızı oklar inhibitör geri beslemeyi göstermektedir (21).

2.3.DİİYABET

DM, pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği ve/veya dokuların insüline cevabının bozulması ile oluşur. Devamlı izlem ve tedavi gerektiren hayat boyu süren kronik bir hastalıktır. Akut ve kronik komplikasyonları sebebiyle yaşam kalitesini oldukça düşürür. Ayrıca topluma ekonomik yükü fazladır (1,3,4,40-47).

DM bilinen en eski hastalıklardandır. İlk olarak Kapodokyalı Arataeus tarafından keşfedilmiştir. Çok idrar yapan ve kilo kaybeden insanları sifonlu fiçıya benzeten Kapodokyalı Arataeus hastalığa “Diabetes” adını vermiştir. 7. yüzyılda Mısırlı, Çinli ve Hintlilerce yapılan çalışmalarda idrarın şekerli olduğu tespit edilmiş ve “Lemadhumeha” ballı idrar olarak tanımlanmışlardır. 11. yüzyılda ise İbn-i Sina, yaptığı çalışmalarda kaynatılan idrarın tortusunda bal tadını belirlemiştir. Laboratuvar yöntemlerinin önem kazanmasıyla 16. Yüzyılda Thomas Willis idrarda şekerin tayinini yapmış ve Claude Bernard kan şekeri ölçümünü gerçekleştirmiştir (48).

Dünya sağlık örgütüne (WHO) göre Dünya genelinde ölümlerin %5’inden fazlası diyabetten kaynaklanmaktadır. 2010 yılında 220 milyon olan diyabetli hasta sayısının, 2025’de 300 milyonu aşması kaçınılmaz görülmektedir. Tüm diyabet vakalarının %5-10’unu Tip I Diabetes Mellitus hastaları oluşturmaktadır (45).

DM, Amerikan Diyabet Derneği (ADA) tarafından sınıflandırılmasına göre; Tip 1 DM, Tip 2 DM, gestasyonel DM ve diğer spesifik diyabet tipleri olmak üzere 4 temel gruba ayrılmaktadır. Bunlardan, Tip 1 DM, Tip 2 DM ve gestasyonel DM primer, diğer spesifik diyabet tipleri ise sekonder diyabet formlarıdır (1,47,49).

Tablo 1: DM etiyolojik sınıflandırması (47).

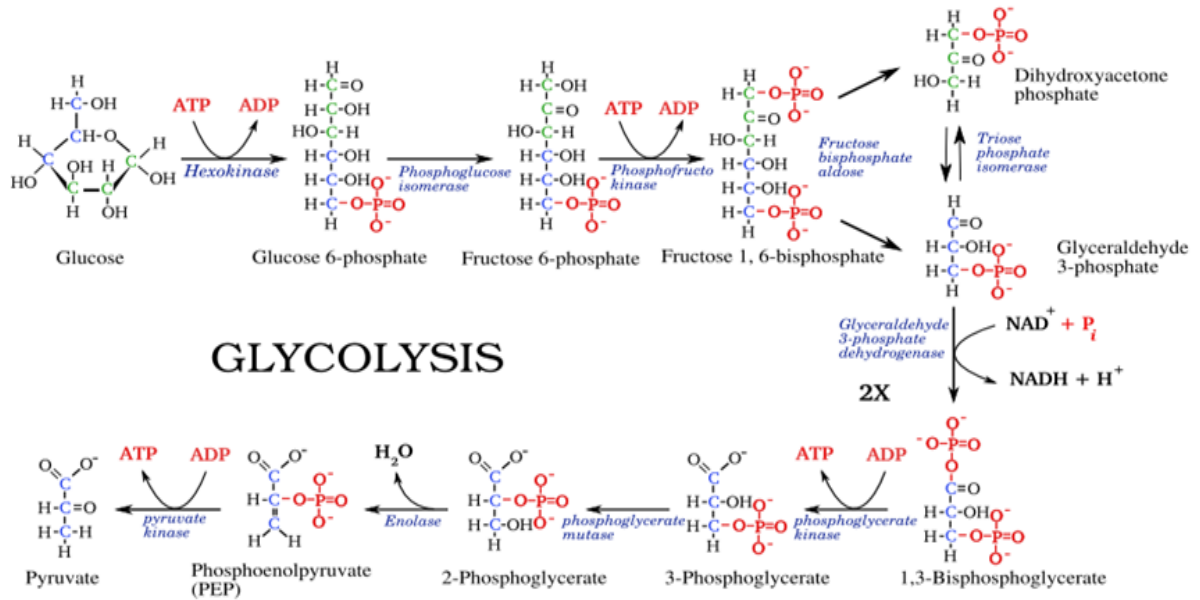
I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır)	
A. İmmün aracılıklı B. İdiyopatik	
II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)	
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet.	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) • 20. Kromozom, HNF-4α (MODY1) • 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) • 12. Kromozom, HNF-1α (MODY3) • 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) • 17. Kromozom, HNF-1β (MODY5) • 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) • 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) • 9. Kromozom, CEL (MODY8) • 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) • 11. Kromozom, INS (MODY10) • 8. Kromozom, BLK (MODY11) • Mitokondriyal DNA • 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu) • Diğerleri B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler • Leprechaunism • Lipoatrofik diyabet • Rabson-Mendenhall sendromu • Tip A insülin direnci • Diğerleri C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları • Fibrokalkülöz pankreatopati • Hemokromatoz • Kistik fibroz • Neoplazi • Pankreatit • Travma/pankreatektomi • Diğerleri D. Endokrinopatiler • Akromegali • Aldosteronoma • Cushing sendromu • Feokromositoma • Glukagonoma • Hipertiroidi • Somatostatinoma • Diğerleri	E. İlaç veya kimyasal ajanlar • Atipik anti-psikotikler • Anti-viral ilaçlar • β-adrenerjik agonistler • Diazoksid • Fenitoin • Glukokortikoidler • α-İnterferon • Nikotinik asit • Pentamidin • Proteaz inhibitörleri • Tiyazid grubu diüretikler • Tiroid hormonu • Vacor • Diğerleri (post transplant diyabet) F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları • Anti-insülin reseptör antikorları • "Stiff-man" sendromu • Diğerleri G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar • Alström sendromu • Down sendromu • Friedreich tipi ataksi • Huntington korea • Klinefelter sendromu • Laurence-Moon-Biedl sendromu • Miyotonik distrofi • Porfiriya • Prader-Willi sendromu • Turner sendromu • Wolfram (DIDMOAD) sendromu • Diğerleri H. Enfeksiyonlar • Konjenital rubella • Sitomegalovirus • Koksaki B • Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

Tip 1 DM; pankreastaki langerhans adacıkları içinde bulunan ve insülin hormonu salgılayan beta hücrelerinin hasarlanması ve/veya beta hücre sayısının azalması ile oluşan diyabet tipidir. Pankreastaki beta hücrelerinde gerçekleşen bu hasarlanma sonunca insülin sekresyonunda bozulma gerçekleşir ve hastalar dışarıdan insülin takviyesine ihtiyaç duyarlar. Bu sebepten dolayı Tip 1 DM, insüline bağımlı DM olarak da isimlendirilmektedir. Genellikle otoimmün kaynaklıdır. Çoğunlukla prepuberte ve puberte dönemlerinde ortaya çıkar. Ancak son yıllarda yetişkinlerde de gözlemlenen Tip 1 DM olguları artmaktadır. Erişkin yaşta gözlenen Tip 1 DM (genellikle 30 yaşından sonra) formu 'erişkinde latent

otoimmün diyabet' (latent autoimmune diabetes in adult, LADA) olarak adlandırılmaktadır. Tip 1 DM tanısı konulduğunda hastaların çoğunda "insülitis" olarak adlandırılan lenfomonositer hücre infiltrasyonu görülmektedir (cytotoxic/supressor T hücreleri). Tip 1 DM'yi çevresel faktörler ve genetik yatkınlık etkilemektedir (5,6,50-52). Tip 1 DM'nin %30-70 oranında kromozom 6'nın kısa kolu üzerindeki MHC (major histokompatibilite kompleksi ile yakın ilişkisi vardır. Tip 1 DM'li hastanın %98'nin üzerindeki diyabetlide Klas II MHC allelleri, DR3 ve DR4 bulunmaktadır (53).

2.4.ETİL PİRÜVAT

Pirüvat; 2-oxopropionat'ın genel kullanım adıdır. Pirüvat kinaz enzimi ile katalizlenen glikolitik yolun son ürünüdür. Pirüvat ayrıca memeli hücrelerinde gerçekleşen pek çok kimyasal yolun ana ve ara maddesi olarak doğada bulunur (16,17,54). Hücre içerisinde antioksidan görevi vardır. Pirüvat artan metabolit yoluyla mitokondriyal biyogenezi sağlamaktadır. Önce trikarboksilik asit döngüsünün inhibitörü olan parapiruvat şekline dönüşür, daha sonra çok daha kararlı bir bileşik olan Etil Pirüvat (EP)'a dönüşmektedir (16).

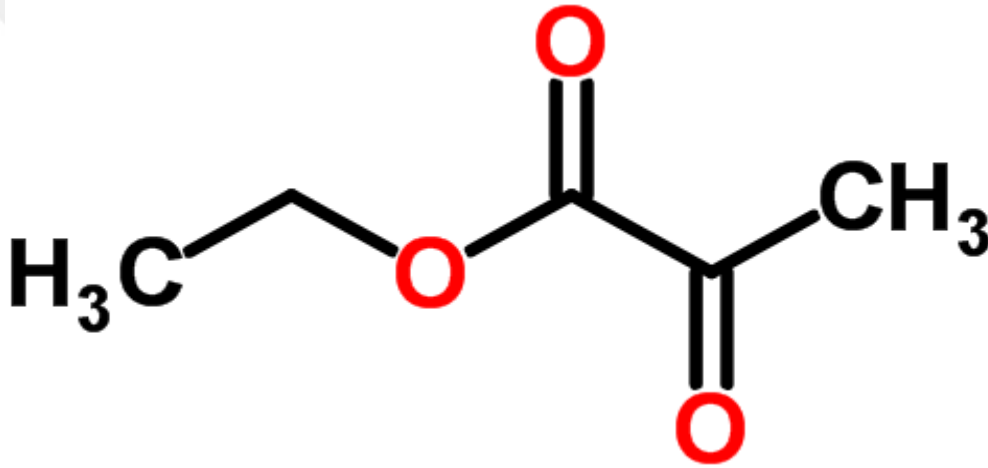


Şekil 12: Glikolizis'in şematik diyagramı.

Pirüvat solüsyonlarda stabil değildir. Sulu çözücülerde çözündüğünde spontan olarak kondansasyona ve siklizasyon reaksiyonuna girer ve bir kısmı toksik etkili olabilen birçok ürün oluşturur. Bu sebepten deneysel araştırmalarda etil esteri olan EP kullanılmaktadır. Etil esterlerinin etkinliğinin piruvat anyonlarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (55).

Pirüvat ve etanoldan sentezlenen EP, kalsiyum ve potasyum içeren dengeli bir solüsyon olan Ringerli Etil Pirüvat Solüsyonunda (REPS) bozulmadan ve etkinliğini kaybetmeden uygulanabildiği belirtilmiştir (16,55).

EP, pirüvik asidin basit alifatik esteridir. Formülü $C_5H_8O_3$ 'dur. Yoğunluğu 1.06, kaynama noktası $144\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve rengi de açık sarıdır (56).



Şekil 13: Etil pirüvat'ın yapısı.

EP'nin endojen metabolitlere yakın benzerliği, hayvanlardaki güvenli kullanımı nedeniyle insanlara zararlı olmadığı kabul edilmektedir ve yemek eki olarak kullanılmaktadır. EP, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (Food and Drug Administration; FDA) genel olarak güvenli bileşikler listesinde yer almaktadır (16).

EP güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvardır. EP'nin bu etkileri, akut pankreatit, retinopati, diyabetik karaciğer hasarı gibi deneysel hayvan modellerinde gösterilmiştir (16,18,19,57,58).

Sonuç olarak etil pirüvat tüm bu etkilerini;

1. Serbest oksijen radikallerini temizlemesi
2. IL-1, IL-6 ve TNF-alfa'nın etkisini azaltması
3. COX-2 ve MİF üretimini azaltması
4. HMGB1'in etkisini azaltması
5. IL-10 üretimini artırması
6. NFkB aktivasyonu ve İNOS üretimini baskılamasıyla gösterir (57).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMA TİPİ

Araştırmamız deneysel niteliktedir.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Araştırmamız Mayıs 2015 tarihinde literatür tarama ile başlamış olup; etik kuruldan onay 29 Mart 2016 tarihinde alındıktan sonra destek alabilmek amaçlı 1002 kapsamında TÜBİTAK'a başvuruldu. Mayıs 2017'de maddi desteğin ulaşması ile malzeme alımları gerçekleştirildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nda ilaç uygulama ve sakrifikasyon yapıldıktan sonra, sol testis biyokimyasal analizler için Fizyoloji Anabilim Dalı'na, sağ testis ise histolojik analizler için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalına getirilerek gerekli işlemler yapıldı. Ocak 2018'de tez yazılması ile sonlandırılmıştır.

TÜBİTAK proje destek belgesi Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

3.3. ARAŞTIRMA EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ÇALIŞMA GRUPLARI

Araştırmada 4 deney grubu olmak üzere toplamda 28 deney hayvanı (sıçan) kullanıldı. Deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi.

I.Grup, Kontrol grubu: Hiçbir madde uygulanmayan, bazal değerler için kullanılan gruptur. Deney başlatıldıktan sonraki 18. günde tüm denekler sakrifiye edildi ve testis doku örnekleri alındı.

II.Grup, Etil Pirüvat (EP) grubu: Deneklere deney başlangıcının 3. gününden itibaren 18. güne kadar günde iki defa intraperitoneal (i.p) yolla 50 mg/kg EP verildi. 18. gün sakrifiye edildi.

III.Grup, Diyabet (DM) grubu: Deneklere ilk gün i.p. yolla tek doz 45 mg/kg STZ verildi.18. gün sakrifiye edildi.

IV.Grup, Diyabet + Etil Pirüvat (DM+EP) grubu: Deneklere ilk gün i.p. yolla tek doz 45 mg/kg STZ verildi. Deney başlangıcının 3. gününden itibaren 18. güne kadar günde iki defa i.p yolla 50 mg/kg EP verildi. 18. gün sakrifiye edildi.

Histolojik incelemeler için alınan sağ testis bouin solüsyonu içine koyuldu. Biyokimyasal incelemeler için alınan sol testis ise deney tüpü ile kuru buz içerisine koyuldu.

3.4.ÇALIŞMA MATERYALI

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen, Wistar Albino suşu toplam 28 adet 10-12 haftalık (200-250 gr) yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel analiz için, her grupta 7 denek olacak şekilde planlandı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık / aydınlık periyodunda, 20–22°C oda sıcaklığında %50-60 nisbi nem bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi (ad libitum). Deneyde kullanılan hayvanların 10-12 haftalık olarak seçilme sebebi, insanda 18-30 yaş aralığına denk gelmesinden dolayıdır.

3.5.ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Bağımsız değişken: Madde uygulamaları (Etil Pirüvat)

Bağımlı değişken: Ölçülen ürünler (MDA, GPx, SOD)

3.6.VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.6.1.Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada denek ağırlıklarını ölçebilmek için hassas terazi, deneklerden elde edilen dokuların doku takibi için etüv, dokuları incelenmek üzere kesit almak için mikrotom, boyamalarda distile su ihtiyacını karşılamak için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeleri yapabilmek için humidity chamber ve otomatik mikropipetleri, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör, spektrofotometre ve buzluk kullanıldı.

3.6.2.Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen testis doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulandı. İnce kesitleri alındı, histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutuldu. Araştırmada histokimyasal inceleme için Hematoksilen-Eozin, PAS (periyodik asit schiff) ve Masson Trikrom histokimya boyamaları, immünohistokimya olarak Aktif

Kaspaz-3 ve TUNEL boyamaları yapıldı. Hematoksilen-Eozin, Masson Trikom, Aktif Kaspaz-3 ve TUNEL boyamaları için 20x büyütmede, PAS boyaması için ise 100x' lik büyütmede inceleme yapılarak image J (1,50) programı ile değerlendirme yapıldı.

Biyokimyasal incelemeler için GSH, GPx, MDA kitleri kullanıldı.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda (sakrifikasyon öncesi) deneklerin ağırlıkları ölçüldü.

3.6.2.2. Denek Kan Değerlerinin Ölçümü

Deney başlangıcında, deneyin 3. günü ve deney sonunda deneklerin kuyruk veninden kan alındı. Kan örneklerinin glukometre ile kan glikoz değerleri ölçüldü (Şekil 15).



Şekil 15: Deney için kan glikoz değerlerinin ölçümü.

3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler

Deneklerden alınan sağ testis doku örnekleri mikroskopik incelemeler için Bouin solüsyonunda fikse edildi. Testis dokuları bütün olarak 24 saat boyunca fiksatifte içinde bırakıldı. Bouin solüsyonuyla fikse edilen dokular, %70'lik alkol içinde sarı renk tamamen çıkana kadar yıkandı. Dereceleri giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonları yapıp, dört değişim aseton ve iki değişim ksilen serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflandırılan dokular parafine emdirme işleminden sonra parafin bloklara gömülme işlemi yapıldı (Tablo 2). Elde edilen parafin bloklardan mikrotomla polilizin kaplı

lamalara 5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin, PAS ve Masson-Trikrom boyama protokolleri uygulanarak ışık mikroskobu altında değerlendirme işlemleri yapıldı. Hematoksilen-Eozin boyaması ile seminifer tübül çapı ölçüldü. Germ hücre ve germ hücre tabakası, interstisyel alandaki Leydig hücreleri ve genel testis morfolojisi incelendi. Masson Trikrrom boyaması ile bağ dokusu yapısı incelendi. PAS boyaması ile bazal membran kalınlığı ölçüldü. TUNEL ve kaspaz-3 boyamaları yapılarak apoptotik hücre sayımı yapıldı. Değerlendirmeler için image J (1.50) programı kullanıldı.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)'nda bulunan Olympus BX 51 Mikroskobu ile histolojik preparatların fotoğrafları çekildi. Testis dokusu değerlendirilirken seminifer tübüllerin çapları, tübül epitel kalınlığı ölçülüp, interstisyel Leydig hücrelerinin dejenerasyonu değerlendirildi. Elde edilen veriler, Johnsen's skorlama yöntemi kullanılarak ortalama değerleri bulundu ve gruplar arasındaki farklılıklar karşılaştırıldı (63).

Tablo 2: Doku takip protokolü

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	Bouin solüsyonu	12-24 Saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	%70'lik Alkol	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	1 Saat
	%70'lik Alkol	1 Saat
	%70'lik Alkol	1 Saat
	%80'lik Alkol	1 Saat
	%96'lık Alkol	1 Saat
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	1'er Saat
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2	1'er Saat
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.2.3.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Johnsen skorlaması için her grupta rastgele 10 adet tübül değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler için One Way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi (Tablo 3).

Tablo 3: Johnsen Testiküler Skorlaması.

Skor	Histolojik Bulgular
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitelyum bozuk ve lümen oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birçok spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10)
5	Spermatozoa/ spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid/ spermatozoa yok
3	Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, Sertoli hücreleri mevcut
1	Tübüller içerisinde hücre yok

3.6.2.3.2. Hematoksilen-Eozin Boya Yöntemi

Alınan parafin kesitler 2 gün 37°C de etüvde bekletildi. 2 saat 60°C de etüvde bekletilen kesitler 20 dakikasını 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda sıcaklığında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %70'a kadar azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Distile suda yıkandıktan sonra 15 dakika Hematoksilen boya solüsyonu içerisinde bekletilip, akan suda 15 dakika yıkama işlemi sonrası suyu süzülüp 1 dakika boyunca eozin boya solüsyonu içerisinde bekletildi. 1'er dakika içerisinde sırasıyla %70, %80, %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi ve 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan ile kapama işlemi yapıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Dehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra 20'er dakikalık üç farklı ksilen serilerinden geçirildiler. Ardından kesitler azalan alkol serilerinden geçirilerek (absolü alkol, %96, %80 ve %70'lik alkol) ve distile suya getirildiler. Kesitler distile sudan çıkarıldıktan sonra Masson Trikrom boyama kitiyle (Bio-optica, 04-010802) boyama işlemleri gerçekleştirildi. Dokular boyama kiti içindeki weigert's hematoksilen- solüsyon A (Reaktif A) ve solüsyon B (Reaktif B) içinde 10 dk bekletildi. Daha sonra yıkanma işlemi yapılmadan pikrik asit alkolde (Reaktif C) 4 dk bekletildi. Distile suyunda çalkalandı. Ardından ponceau-asit fuksin solüsyonunda (Reaktif D) 4 dakika

boyandı. Distile suda yıkandı. Preparat 10 dakika fosfomolibdik asitte (Reaktif E) tutuldu. Ardından masson anilin mavisi solüsyonunu (Reaktif F) döküldü, 5 dakika bekletildi. Distile suda yıkandı. Daha sonra absol alkolü takip eden %95'lik alkolde dehidrate edildi ve yıkandı. Ksilol ile şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapama işlemi yapıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Masson Trikrom boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif A+ Reaktif B solüsyonu	10 dakika
Boyama	Reaktif C	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif D	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif E	10 dakika
Boyama	Reaktif F	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.4. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemi

Bazal membran kalınlığındaki değişiklikleri incelemek için PAS boyaması yapıldı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 saat 60°C de etüvde bekletildi. Ardından bir saati 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda sıcaklığında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %60'a kadar azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra PAS (Periyodik Asit Schiff) boyama kiti (Bio-optica, 04-130802 Milano, İtalya) içerisinde periyodik asit solüsyonu (Reaktif A) içerisinde 10 dakika bekletildi. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 2-3 dakika distile suda bekletilen kesitler suyu süzölüp 20 dakika Schiff boya solüsyonu (Reaktif B) içerisinde bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkanan kesitlerin üstüne potasyum metabisülfıt solüsyonunu (Reaktif C) konularak 2 dk bekletildi. Kesitlere yıkama işlemi yapılmadan fiksatif solüsyonu (Reaktif D) konularak 2 dk bekletildi. Boyama işleminin ardından kesitler distile suda iyice yıkandıktan sonra Mayers hematoksilen solüsyonu (Reaktif E) içinde 3 dk bekletildi. Boyamadan sonra 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler daha sonra %96'lık alkolle çalkalanıp 3 kez 20'şer dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Dehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 dakika
Boyama	Reagent D	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'luk alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4.İmmünohistokimyasal İncelemeler

TUNEL boyaması ile fragmente nükleuslar, aktif kaspaz-3 immün işaretlemesi ile sitoplazma koyu kahverengi boyandı.

3.6.2.4.1.TUNEL Boyama Yöntemi

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerdeki DNA fragmentasyonunun gösterilmesi için immünohistokimyasal yöntemler kullanıldı. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinnükleotidler eklendi. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edildi. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı

bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Hematoksilen ile art alan boyaması yapılarak işlem sonlandırıldı.

Apopitoza giden hücre çekirdeklerini DNA fragmentasyonu hesaplaması terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nickend-labeling (TUNEL) reaksiyonuyla parafin kesitlerde ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apopitozis Detection Kit (Millipore) kullanılarak yapıldı. Deparafinizasyon sonrası kesitler önce 37°C de 10 dakika Proteinaz K uygulandı. Endojen peroksidazın bloke edilmesi için %3'lük hidrojen peroksit uygulandı ve daha sonra kesitler dengeleme solüsyonunda 30 dk bekletildi. Ardından sırasıyla tdt enzimi, stop/wash solüsyonu ve anti-digoksinin peroksidaz uygulandı ve sonra DAB (diaminobenzidine) ile boyandı ve Mayer Hematoksilen ile zıt boyaması yapıldı yapılan kesitler, alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işleminden sonra kesitlere entellan ile kapama işlemi yapıldı.

3.6.2.4.2.Aktif Kaspaz-3 Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal inceleme için deparafinizasyon sonrası kesitler 10 dk. 10 Mm sitrat buffer ile mikrodalgada ısıtıldı. Dakopen ile çevreleri sınırlandırıldı ve daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan Anti-Kaspaz 3 aktive form 1:100 (AB3623, Millipore) antikoru ile +4°C de enkübe edildi. Ardından önce 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor daha sonra da 30 dakika enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflştırma işleminden sonra entellan ile kapama işlemi yapıldı.

3.6.2.5.Biyokimyasal İncelemeler

Sakrifikasyonda 1-2 dakika içinde soğuk zemin üzerinde testis dokuları alındı. Dokular soğuk serum fizyolojik ile yıkanarak ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), antioksidan Glutasyon (GSH) ve antioksidan enzim Glutasyon Peroksidaz (GPx) ölçümü için homojenize edildi. Doku örnekleri ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) 0.15 M KCl içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı. Homojenatlar +4°C'de 600 g'de 10 dk santrifüj edilerek MDA ölçümü için ependorf tüpüne ayrıldı ve geri kalan homojenat +4°C'de 10000

g'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant enzim ve protein ölçümleri için ayrılarak -80°C'de saklandı. Ölçümler 30 gün içinde yapıldı.

3.6.2.5.1.MDA, GSH ve GPx Düzeylerinin Saptanması

MDA değerleri The Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Kitin çalışma yöntemi kromojenik bir reaktif ile MDA'nın 45°C'de reaksiyona girmesi temeline dayanır. Spektrofotometre (T80, PG instruments, UK) ile 586 nm'de absorbans ölçülerek standart eğrisinden MDA değerleri belirlendi.

GSH seviyeleri Bioxytech GSH-420 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. Kitin çalışma yöntemi chromophoric thione oluşumu temeline dayanır. Tamponla karıştırılan süpernatanta indirgeyici ajan eklenerek oksidize glutatyon indirgenmiş forma dönüştürüldü. Daha sonra kromojen eklenip pH artırılarak chromophoric thione oluşturuldu. 420 nm'de absorbans ölçülerek GSH konsantrasyonu belirlendi.

GPx aktivitesi Bioxytech GPx-340 (Oxis International, USA) kiti ile saptandı. Bu kit Paglia ve Valentine'in tanımladığı yöntemle göre hazırlandı. GPx, kümen hidroperoksit ile glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH okside olarak NADP' ye dönüşür. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbansdaki azalma ölçüldü.

Doku protein ölçümleri RANDOX'un U/CSF protein kitiyle yapıldı. Kitin çalışma prensibinde önce örnek magnezyum iyonlarını uzaklaştırmak ve proteini çöktürmek amacıyla EDTA içeren alkalın solüsyonla karıştırıldı, sonra benzethonyum klorid eklendi ve turbidite oluşturarak spektrofotometrede 600 nm' de absorbans okundu.

3.7.ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ



3.8.VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm veriler SPSS 23,0 istatistik programına yüklendi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Gruplar arasındaki farklar Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı (64).

Biyokimyasal değerlendirme de ise tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar SPSS programında one-way ANOVA post hoc LSD testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

3.9.ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, Wistar Albino suşu toplam 28 adet 10-12 haftalık (200-250gr) yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Deneklere STZ verilerek diyabet oluşturuldu. 18 günlük deney sırasında 1 adet Wistar Albino sıçan deneyin 8. gününde öldü. Ayrıca etil pirüvat grubunda 2 adet Wistar Albino sıçanda farklı hastalıkların görülmesinden dolayı denekler deneyden çıkarıldı. Bu sonuçlar istatistiksel verileri etkilemedi. Sınırlılığımız fonksiyonel olarak fertilitenin değerlendirilememesidir. Deney öncesi ve sonrasında spermiyum sayısı, morfolojisi hareketliliği, canlılığına bakabilmek verilerimizi güçlendirirdi.

3.10.ETİK KURUL ONAYI

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 29 Mart 2016 tarihinde gerçekleştirilen toplantıda, 19/2016 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

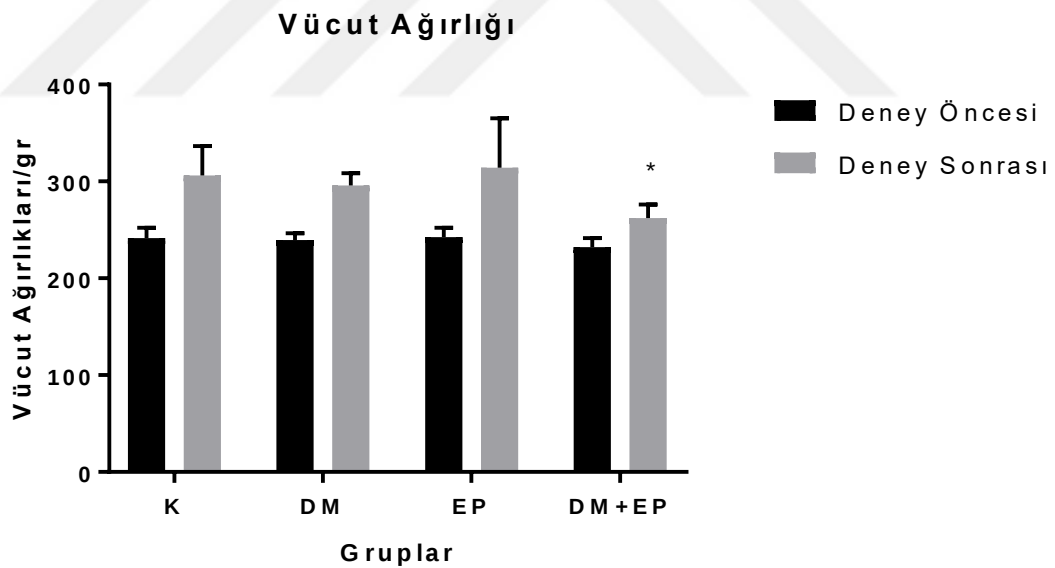
Etik kurulun onay belgesi Ek-2 olarak teze eklenmiştir.

4.BULGULAR

4.1.DENEK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Deneyin başlangıcında ve deneyin sonunda (sacrifikasyondan önce) deneklerin ağırlıkları ölçüldü. Grupların deney başlangıcındaki ağırlık ortalamaları; Kontrol grubunda $241,571 \pm 4,064$ gr, Diyabet grubunda $239,571 \pm 2,940$ gr, Etil pirüvat grubunda $241,857 \pm 4,214$ gr ve Diyabet +Etil pirüvat grubunda ise $231,571 \pm 5,652$ gr olarak bulundu. Deneyin bitiş ağırlık ortalamaları ise; Kontrol grubunda $306,142 \pm 11,521$ gr, Diyabet grubunda $295,833 \pm 3,938$ gr, Etil pirüvat grubunda $299,857 \pm 14,832$ gr ve Diyabet + Etil pirüvat grubunda ise $270,142 \pm 7,401$ gr olarak bulundu.

Bu bilgiler doğrultusunda; tüm gruplarda deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0.05$). Gruplar arasında değerlendirme yapıldığında, kontrol grubuna göre, diyabet+ etil pirüvat grubunda anlamlı bir fark gözlemlendi ($p = 0,021$). Diğer gruplar arasında istatistiksel değerlendirmeler sonucunda anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 16).



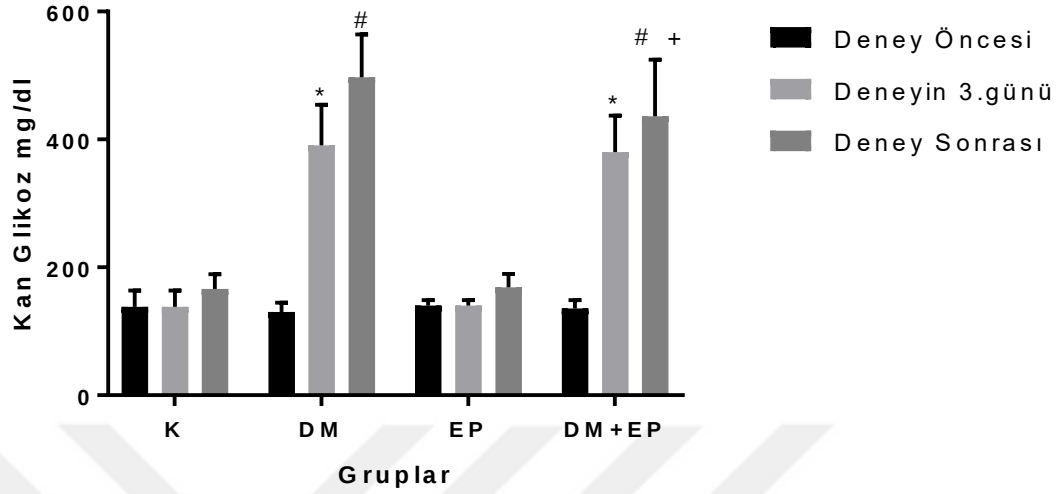
Şekil 16: Denek ağırlıklarının değerlendirilmesi. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p < 0.05$).

4.2.DENEK KAN GLİKOZ SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Deneyin başlangıcında ve deneyin sonunda kan glikoz seviyeleri ölçüldü. Ayrıca deneyin başlangıcından sonraki 3. günde Diyabet ve Diyabet + Etil pirüvat gruplarının kan glikoz değerlerine bakıldı. Grupların deneyin başlangıcındaki kan glikoz seviyeleri ortalamaları; Kontrol grubunda $138,285 \pm 9,702$ mg/dl, Diyabet grubunda $130,285 \pm 6,137$ mg/dl, Etil pirüvat grubunda $139,428 \pm 3,668$ mg/dl ve Diyabet +Etil pirüvat grubunda ise $135,714 \pm 4,853$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Deneyin sonundaki kan glikoz seviyeleri ortalamaları ise; Kontrol grubunda $166,428 \pm 8,554$ mg/dl, Diyabet grubunda $415,833 \pm 76,941$ mg/dl, Etil pirüvat grubunda $169,428 \pm 9,368$ mg/dl ve Diyabet + Etil pirüvat grubunda ise $436,142 \pm 33,506$ mg/dl olarak bulundu. Deneyin başlangıcından sonraki 3. günde yapılan kan glikoz seviyelerinin ortalaması ise; kontrol grubunda $142,465 \pm 8,792$, Diyabet grubunda $390,5 \pm 26,016$ mg/dl, etil pirüvat grubunda $142,738 \pm 4,332$ Diyabet + Etil pirüvat grubunda ise $380,285 \pm 21,438$ mg/dl olarak bulundu.

Bu bilgiler doğrultusunda; kontrol grubunda ve etil pirüvat grubunda deneyin 3.günü ve deney sonu kan glikoz değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol grubuna göre, diyabet ve diyabet+ etil pirüvat gruplarının anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Kontrol grubuna göre diyabet ve diyabet+ etil pirüvat grubunun deney sonu kan glikoz seviyelerinde anlamlı artışın olduğu gösterildi ($p = 0,02$). Ayrıca diyabet grubu ile diyabet+ etil pirüvat grubu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olduğu gösterildi ($p = 0,004$). (Şekil17).

Kan Glikoz Düzeyleri



Şekil 17: Kan glikoz seviyeleri değerlendirmesi. Kontrol grubuna göre 3.gün değerleri anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre deney sonu değerleri anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). Diyabet grubuna göre deney sonu değerleri anlamlı olarak farklı olanlar artı (+) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$).

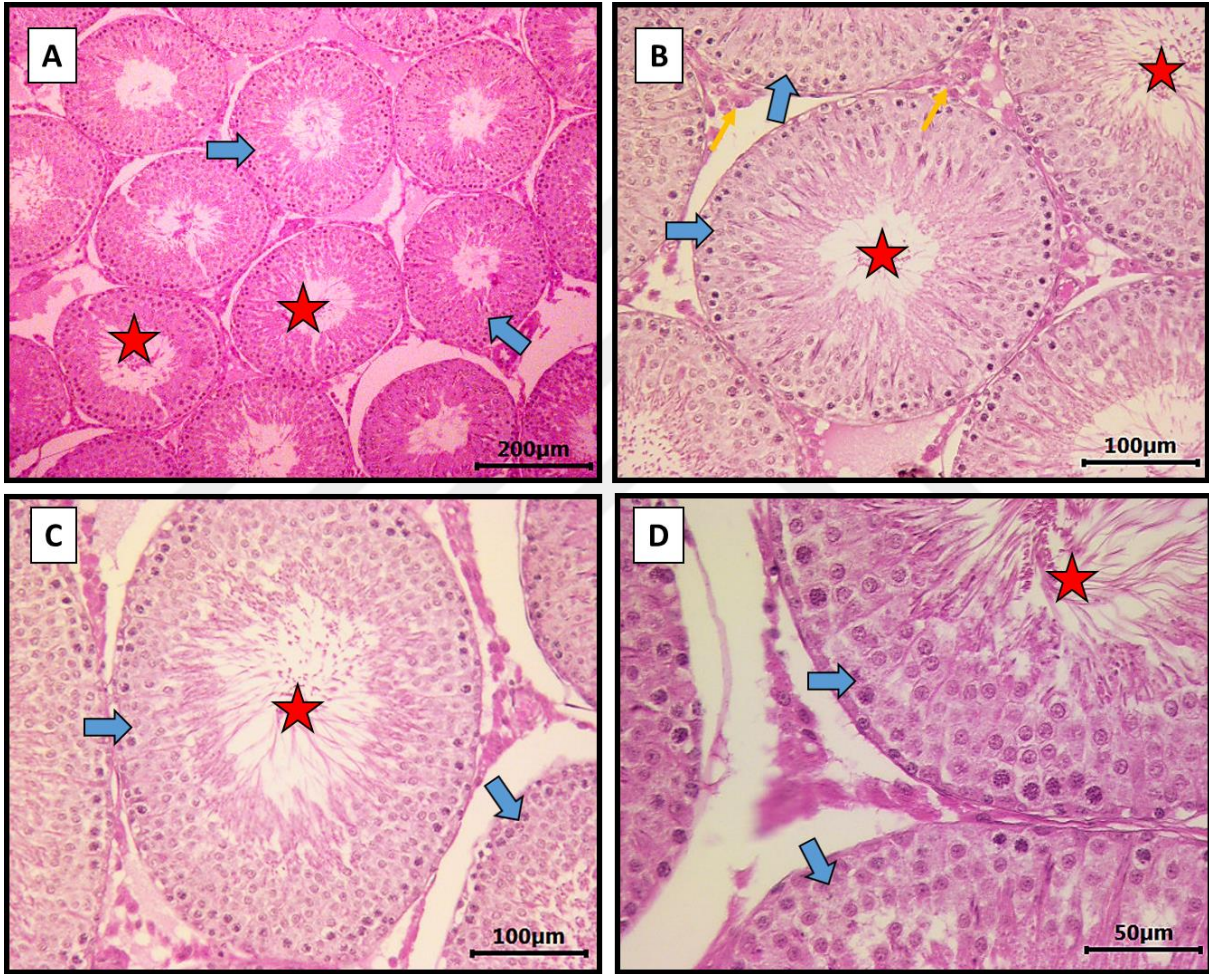
4.3.HİSTOLOJİK BULGULAR

4.3.1.İşık Mikroskopik Bulgular

4.3.1.1.Hematoksilen-Eozin Boyama Değerlendirmesi

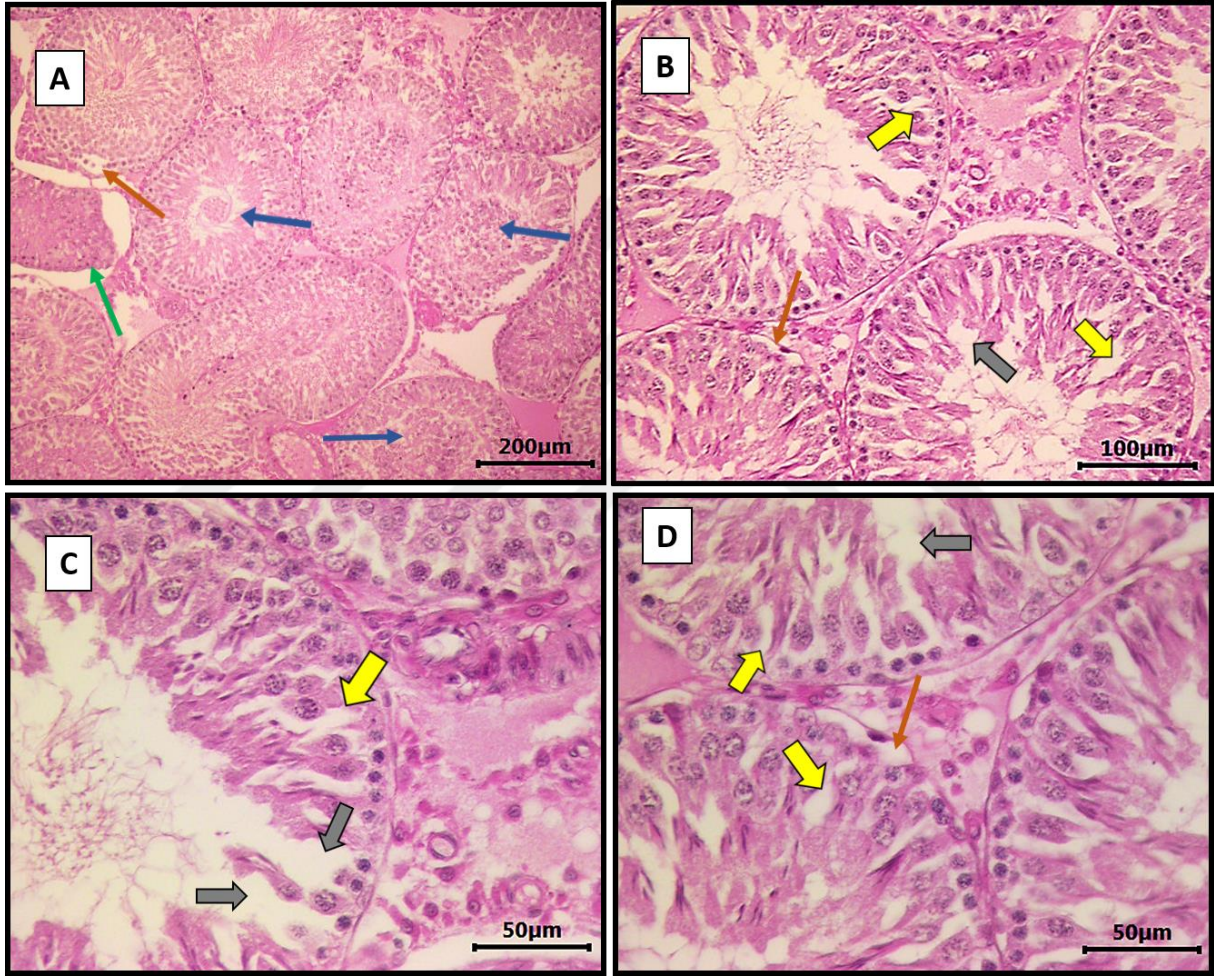
Hematoksilen-Eozin boyama yöntemiyle; testisin bağ dokusu, kapsül (Tunica albuginea), seminifer tübül çapı, seminifer tübül epiteli, interstisyel alandaki Leydig hücreleri ve genel testis morfolojisi incelendi. Seminifer tübüllerin değerlendirmesini Johnsen skorlaması ile yapıldı.

Kontrol Grubu; testis kesitleri incelendiğinde, en dışta kapsül (Tunica albuginea) ile sarılıydı ve seminifer tübül çapları birbirine yakındı. Seminifer tübüllerde bazal membran üzerinde yerleşmiş olan spermatogenetik seri hücreleri; spermatogonyumlar, spermatositler (primer, sekonder) ve spermatidler arasında yer alan sertoli hücreleri gözlemlendi. Seminifer tübüllerin lümeninde gelişmekte olan ve gelişmiş haldeki spermatidler mevcuttu. İnterstisyel alanda ise Leydig hücreleri, bağ doku hücreleri, kan ve lenf damarları bulunuyordu. Ayrıca tübüllerin çevresinde yassı, uzun çekirdekli hücreler olan myoid hücreleride gözlemlendi (Şekil18).



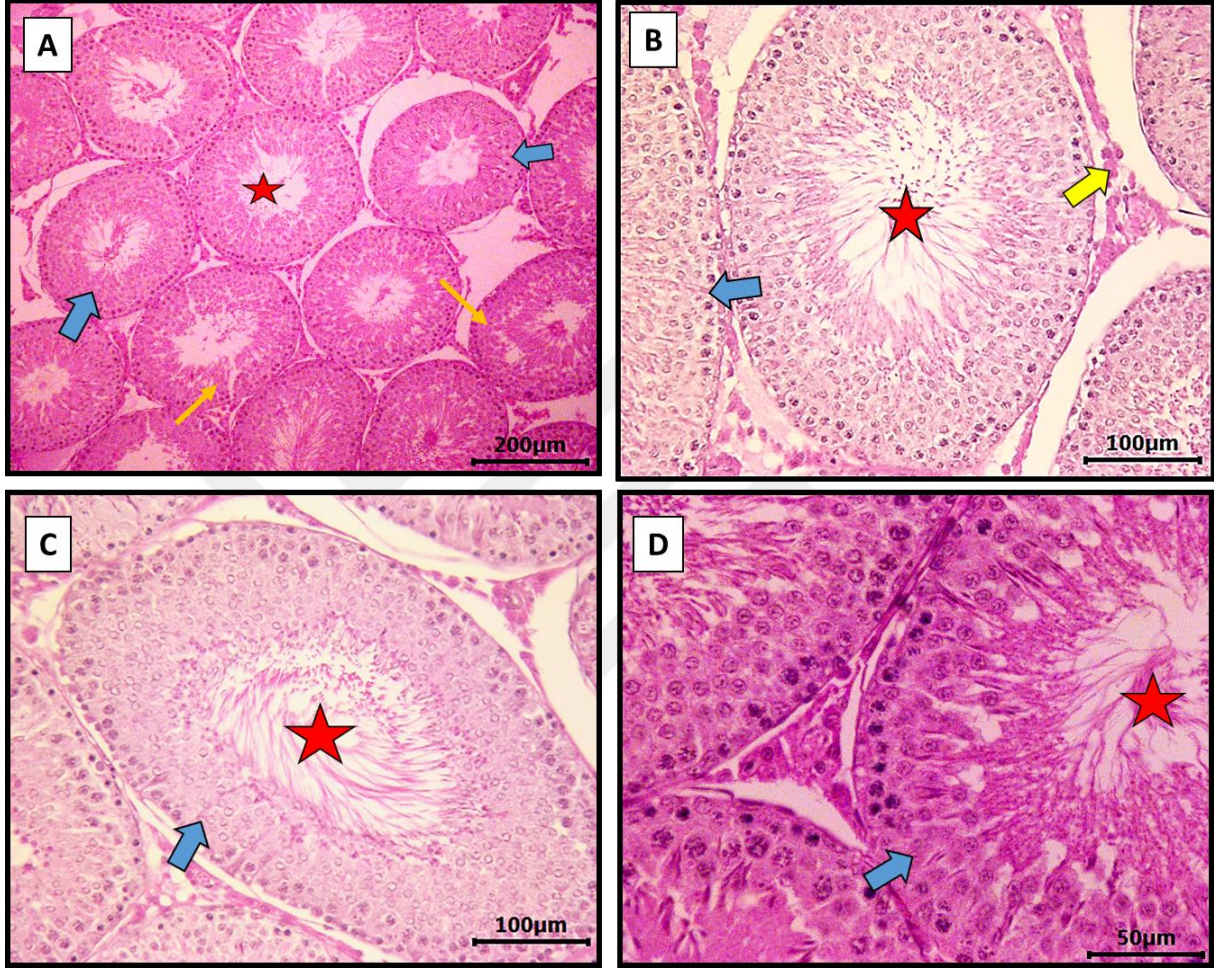
Şekil 18: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A;** 10x, **B-C;** 20x, **D;** 40x’lik görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiyumları kırmızı yıldız (★) ile gösterilmektedir. Düzenli spermatogenetik seri hücreleri mavi ok (➡) ile gösterilmektedir. Turuncu ok (➡) ile Leydig hücreleri gösterilmektedir.

Diyabet grubunda testis dokuları en dışta kapsül ile sarılıydı ancak kapsül ve çevresinde kalın duvarlı büyük damarlar gözlendi. Seminifer tübüllerin çaplarında daralma ve şekillerinde bozukluk olduğu saptandı. Ayrıca spermatogenetik hücre serilerinde ve spermiyumlarda kayıp, bazal membran ile spermatogenetik hücre arasında kopma, spermatogenetik seri hücreleri arasında çok çekirdekli hücre varlığı ve seminifer tübüllerde vakuol gözlendi. Birçok seminifer tübül lümeninde dökülmüş hücre kalıntıları saptandı. İnterstisyel alanda hücre kaybı, kan damarlarının duvarlarında kalınlaşma belirlendi (Şekil 19).



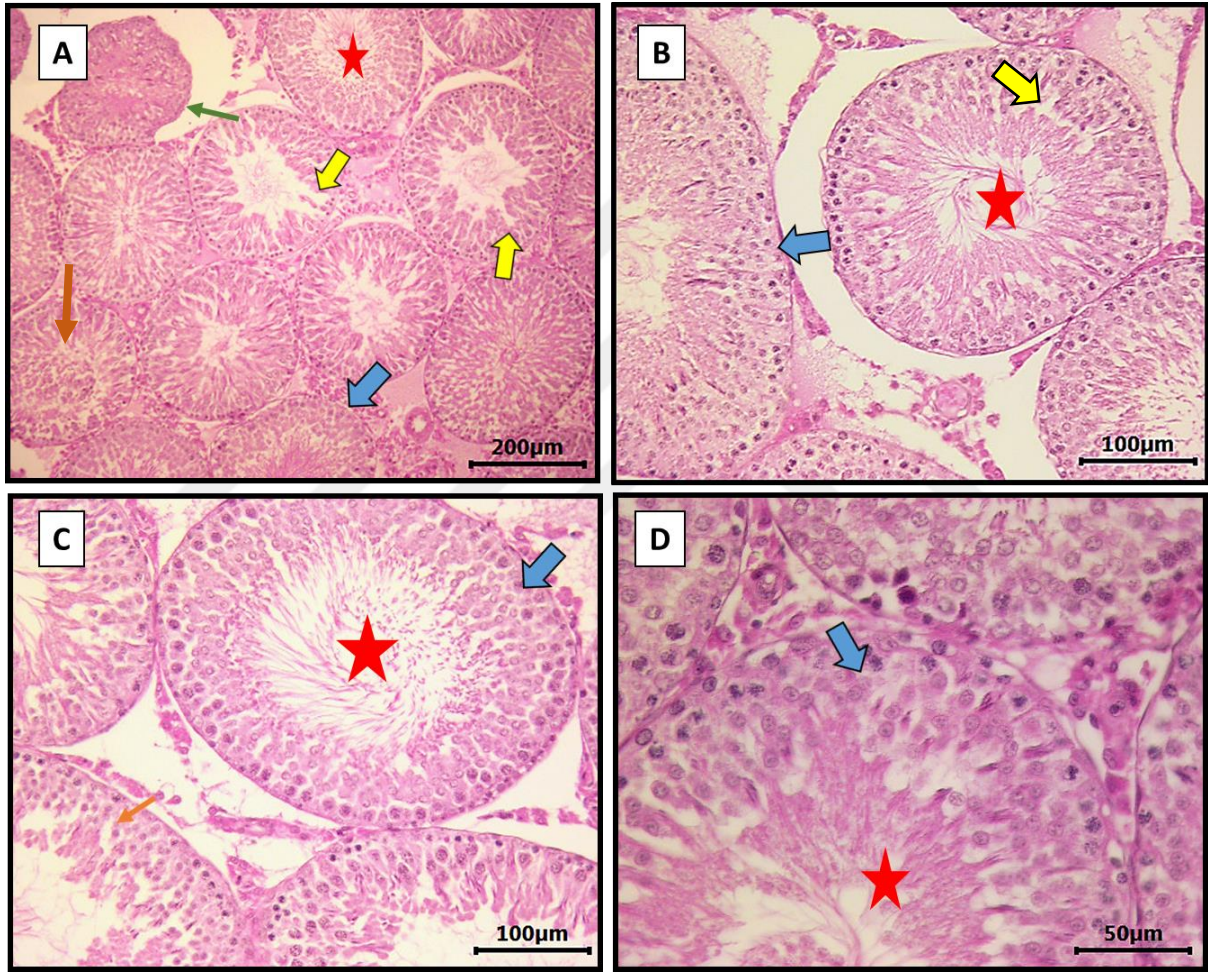
Şekil 19: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A;** 10x, **B;** 20x, **C-D;** 40x'lik görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, mavi ok (→) ile seminifer tübüllerin lümenine dökülmüş hücreleri gösterilmektedir. Yeşil ok (→) atretik tübülleri göstermektedir. Sarı ok (→) spermatogenetik seri hücreleri arasındaki vakuolleşmeyi göstermektedir. Kahverengi ok (→) spermatogenetik hücreleri ile bazal membran arasındaki kopmayı göstermektedir. Gri ok (→) spermatogenetik hücre seri kaybını gösterilmektedir.

Etil Pirüvat grubu kesitleri incelendiğinde, testis dokuları dışardan kapsül ile sarılıydı ve seminifer tübül çapları kontrol grubuna benzer bir yapıdaydı. Seminifer tübüllerde normal spermatogenetik hücre serileri gözlemlendi ve interstisyel aralık kontrol grubuna benzer özelliklerdeydi (Şekil 20).



Şekil 20: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A**; 10x, **B-C**; 20x, **D**; 40x’lik görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiyumları kırmızı yıldız (★) ile gösterilmektedir. Düzenli spermatogenetik seri hücreleri mavi ok (→) ile gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile Leydig hücreleri gösterilmektedir. Turuncu ok (→) ile spermatogenetik seri hücreleri arasındaki vakuolleşmeyi göstermektedir.

Diyabet + Etil Pirüvat grubu kesitlerinde diğer gruplar gibi testis dokusu kapsül ile çevrili olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerinde çapların ve seminifer tübüllerin şekillerinin normale benzer olduğu gözlemlendi. Diyabet grubuna göre, spermatogenetik seri hücrelerinin tam olarak bulunduğunu seminifer tübül sayısında artış gözlemlendi. İnterstisyel aralıkta ise Leydig hücreleri, bağ doku hücreleri, kan ve lenf damarları bulunduğunu ve bunların bir bütünlük gösterdiği saptandı. Seminifer tübüllerde vakuolizasyon gözlenmedi ve kalın duvarlı damar sayısında azalma olduğu tespit edildi (Şekil 21).

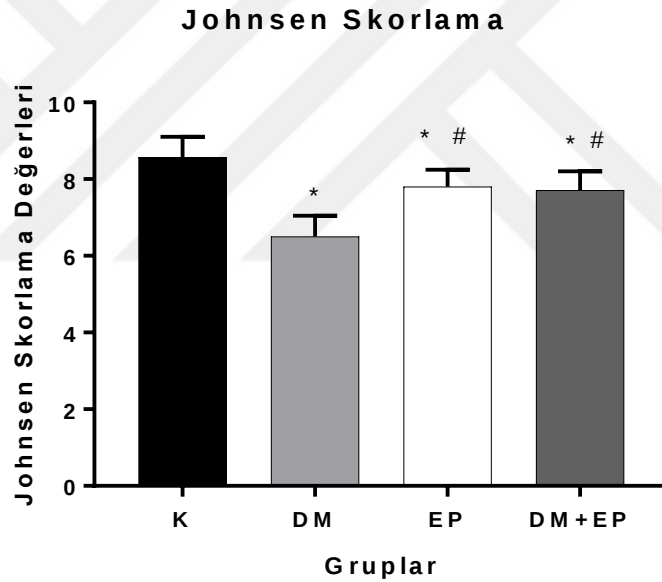


Şekil 21: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (H-E) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A**; 10x, **B-C**; 20x, **D**; 40x'lik görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiyumları kırmızı yıldız (★) ile gösterilmektedir. Düzenli spermatogenetik seri hücreleri mavi ok (→) ile gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile spermatogenetik seri hücreleri arasındaki vakuolleşmeyi göstermektedir. Yeşil ok (→) atretik tübülleri göstermektedir. Kahverengi ok (→) seminifer tübül lümenindeki dökülmüş hücreleri göstermektedir.

4.3.1.1.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Johnsen skorlama yöntemi ile elde edilen gruplar arasındaki değerlerin ortalamaları sırasıyla; kontrol grubu $8,571 \pm 202$, diyabet grubu $6,5 \pm 223$, etil pirüvat grubu $7,8 \pm 200$ ve diyabet + etil pirüvat grubu $7,714 \pm 184$ olarak saptandı.

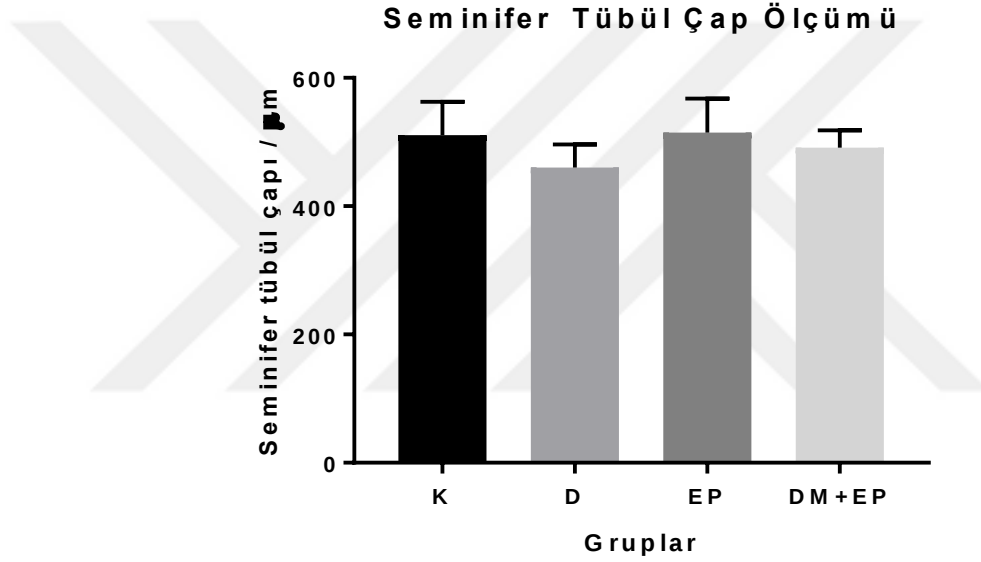
Tüm gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre diyabet, etil pirüvat, diyabet+ etil pirüvat gruplarında Johnsen testiküler biyopsi skorlarında anlamlı derecede azalmanın olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p=0,0001$, $p=0,0253$, $p=0,0086$). Diyabet grubunda ise etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat gruplarına göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,0022$, $p=0,0014$). Ayrıca diyabet+ etil pirüvat grubu ile etil pirüvat grupları kıyaslandığında bu iki grup arasında anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). (Şekil 22). Değerlendirmeler Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri ile yapıldı.



Şekil 22: Johnsen Testiküler Skorlaması. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p < 0.05$). Diyabet grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p < 0.05$).

4.3.1.1.2.Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Tüm grupların seminifer tübül çap değerleri Tablo 7’de gösterilmektedir. Deneklerden elde edilen dokularda seminifer tübül çaplarının ölçümü Image J programı ile yapıldı. Her preperatta 20 adet tübül çapı ölçüldü ve her grup için ortalama değerler alındı. Gruplar arasındaki ortalamalar; kontrol grubu $510,934 \pm 19,64 \mu\text{m}$, diyabet grubu $460,273 \pm 14,6 \mu\text{m}$, etil pirüvat grubu $512,594 \pm 23,68 \mu\text{m}$ ve diyabet + etil pirüvat grubunda ise $491,014 \pm 10,3 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Diyabet grubunda diğer gruplara göre azalma gözlemleniyse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Tüm gruplar karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). (Şekil 23).

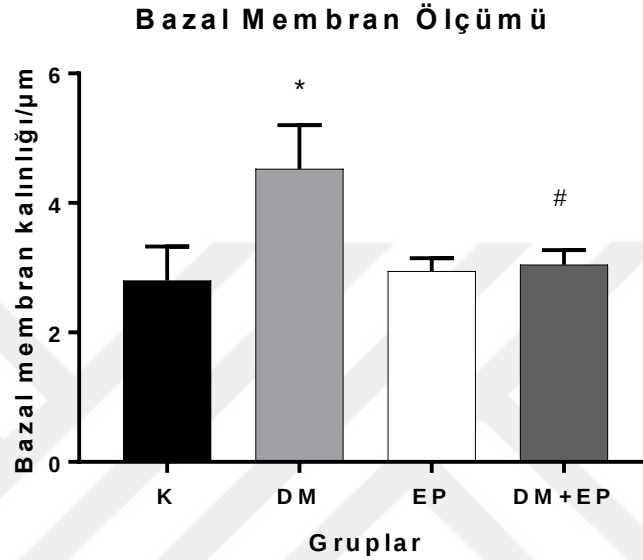


Şekil 23: Seminifer tübül çapı değerleri.

4.3.1.2.PAS Boyama Değerlendirmesi

Tüm grupların seminifer tübül bazal membran kalınlık değerleri Tablo 7’de gösterilmektedir. Deneklerden alınan testis dokularından seminifer tübüllerin bazal membran kalınlığı ölçüldü. Bu değerlendirme için testis dokularına periyodik asit schiff (PAS) boyama protokolü uygulandı. Boyama sonunda elde edilen örneklerde seminifer tübüllerin bazal membran kalınlığını 100x ‘lık objektifte Image J programı ile ölçümü gerçekleştirildi. Bu verilere göre; kontrol grubunda $2,804 \pm 197 \mu\text{m}$, diyabet grubunda $4,525 \pm 275 \mu\text{m}$, etil pirüvat grubu $2,945 \pm 091 \mu\text{m}$ ve diyabet + etil pirüvat grubunda ise $3,047 \pm 084 \mu\text{m}$ değerleri elde edildi.

Tüm gruplardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre diyabet grubunda anlamlı bir artış olduğunu tespit edildi ($p=0,0003$). Kontrol grubuna göre diyabet+ etil pirüvat ve etil pirüvat gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gözlemlendi. Diyabet grubuna göre diyabet+ etil pirüvat ve etil pirüvat grubunda anlamlı bir azalmanın olduğunu belirlendi (sırasıyla $p=0,0002$, $p=0,0007$). (Şekil 24).



Şekil 24: Bazal membran kalınlığı. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). Diyabet grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$).

Kontrol Grubu; kesitleri incelendiğinde, bazal membran kalınlığının ve seminifer tübül çaplarının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 25).



Şekil 25: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri. Sarı ok(→) ile seminifer tübül bazal membranı gösterilmektedir (40x).

Diyabet Grubu; kesitleri incelendiğinde, bazal membran kalınlığında artış olduğu ve seminifer tübül çapında ise azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 26).



Şekil 26: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri. Sarı ok (→) ile seminifer tübül bazal membranı gösterilmektedir (40x)

Etil Pirüvat Grubu; kesitleri incelendiğinde, bazal membran ve seminifer tübül çapları kontrol grubundakine benzer bir yapıya sahip olduğunu tespit ettik (Şekil 27).



Şekil 27: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri. Sarı ok (→) ile seminifer tübül bazal membranı gösterilmektedir (40x).

Diyabet+ Etil Pirüvat Grubu; kesitleri incelendiğinde, bazal membran ve seminifer tübül çaplarının kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 28).

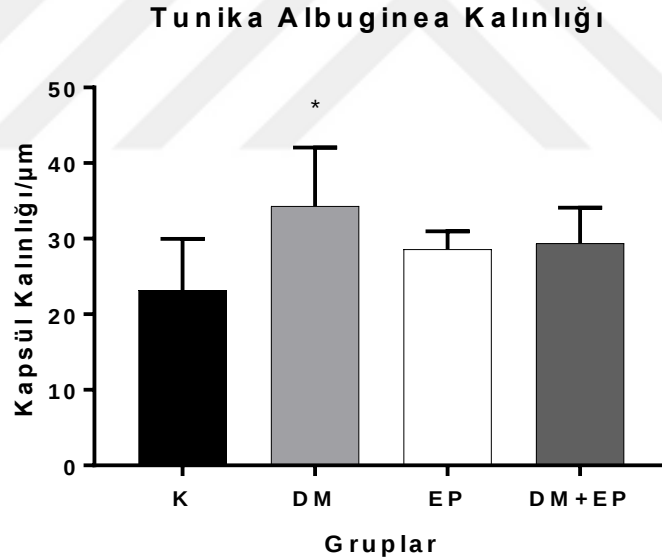


Şekil 28: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri. Sarı ok (→) ile seminifer tübül bazal membranı gösterilmektedir (40x)

4.3.1.3. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi

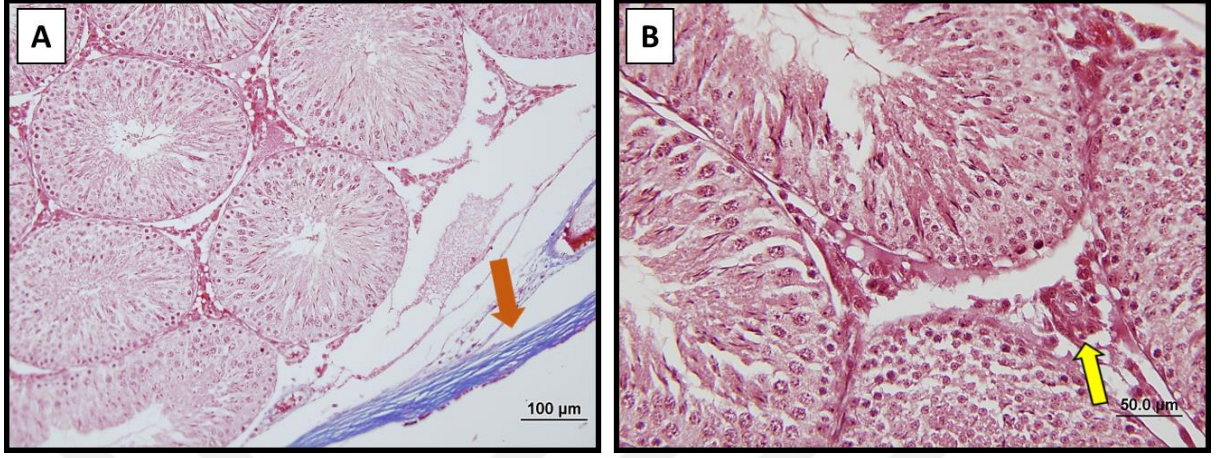
Tüm grupların tunika albuginea kalınlık değerleri Tablo 7’de gösterilmektedir. Kapsül kalınlığının incelenmesi için Masson-Trikrom boyaması yapıldı. Değerlendirme işlemi image J programı kullanıldı. Bu verilere göre; kontrol grubunda $23,199 \pm 2,56 \mu\text{m}$, diyabet grubunda $34,306 \pm 3,14 \mu\text{m}$, etil pirüvat grubunda $28,62 \pm 1,055 \mu\text{m}$ ve diyabet + etil pirüvat grubunda ise $29,4 \pm 1,78 \mu\text{m}$ olarak bulundu.

Tüm gruplardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre diyabet grubunda tunika albuginea kalınlığının anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p=0,0187$). Ayrıca diyabet grubunda kontrol grubuna göre interstisyel alanda bağ doku artışının olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Ayrıca diyabet grubu ile etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). (Şekil 29).



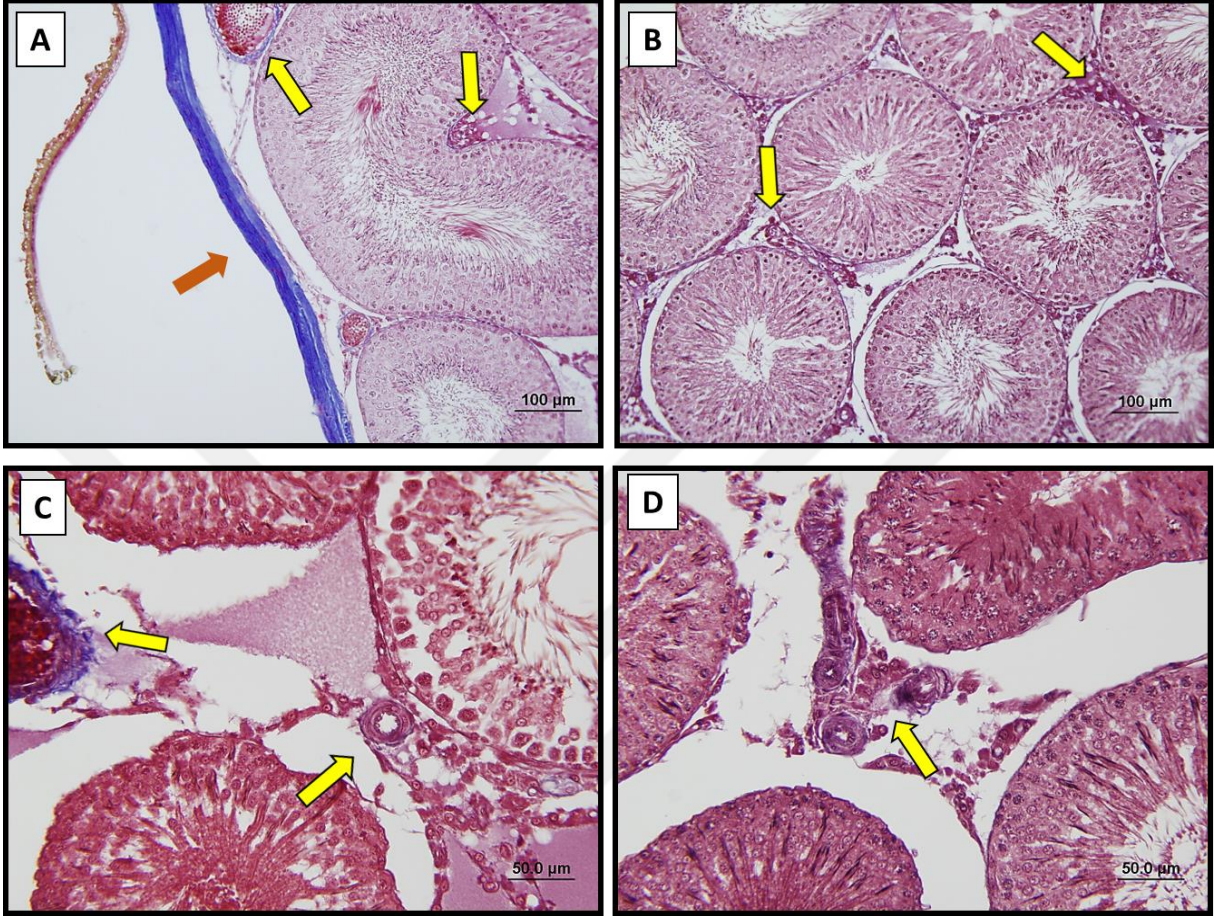
Şekil 29: Tunika albuginea ölçüm değerleri. Kontrol grubuna göre Tunika albuginea kalınlığı anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p < 0.05$).

Kontrol Grubu; kesitleri incelendiğinde, tunika albuginea ve interstisyel alan yapısının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 30).



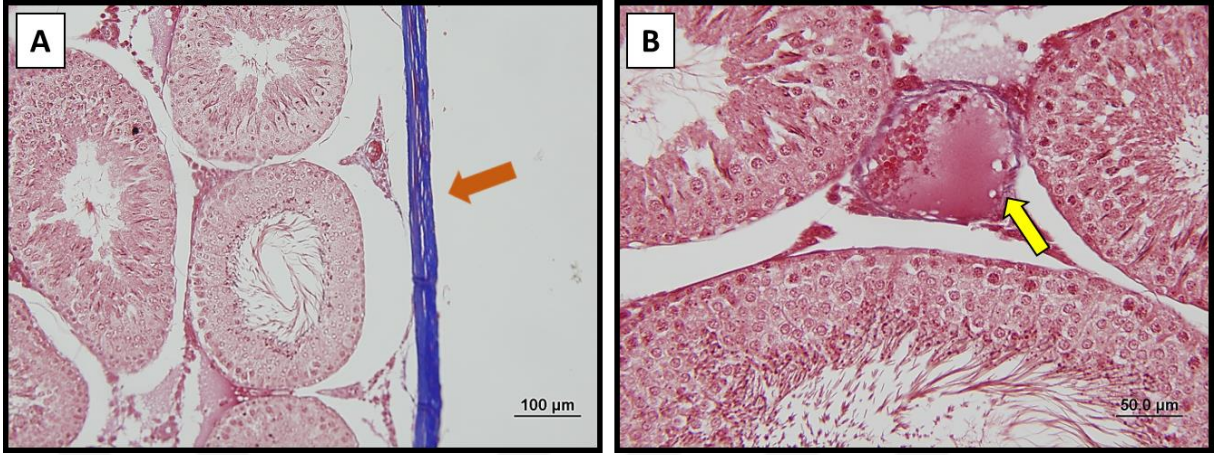
Şekil 30: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A**; 20x, **B**; 40x'lik görüntüleri gösterilmektedir. Kahverengi ok (→) ile tunika albuginea gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

Diyabet Grubu; kesitleri incelendiğinde, tunika albuginea ve interstisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi (Şekil 31).



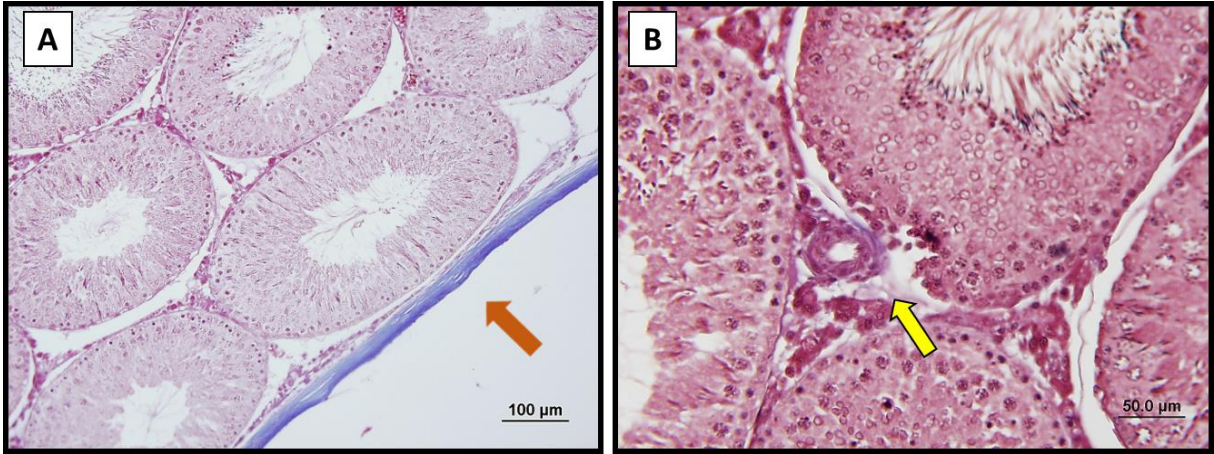
Şekil 31: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A-B**; 20x, **C-D**; 40x'lik görüntüleri gösterilmektedir. Kahverengi ok (→) ile tunika albuginea gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

Etil Pirüvat Grubu; kesitleri incelendiğinde, tunika albuginea da kalınlığın arttığı ancak interstisyel alanda bağ doku artışının olmadığı gözlemlendi (Şekil 32).



Şekil 32: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A**; 20x, **B**; 40x’lik görüntüleri gösterilmektedir. Kahverengi ok (→) ile tunika albuginea gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

Diyabet+ Etil Pirüvat Grubu; kesitleri incelendiğinde, tunika albuginea ve interstisyel alanda diyabet grubuna göre bağ dokusunda azalmanın olduğu ve bu değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 33).



Şekil 33: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A**; 20x, **B**; 40x’lik görüntüleri gösterilmektedir. Kahverengi ok (→) ile tunika albuginea gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

Tablo 7: Seminifer tübül çapı, tunika albiginea ve bazal membran kalınlığı değerleri

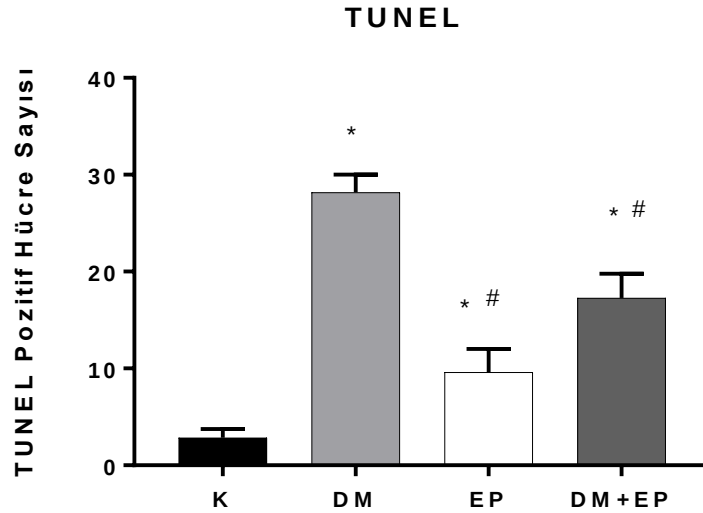
Grup	n	Seminifer Tübül apı	Tunika Albuginea Kalınlığı	Bazal Membran Kalınlığı
Kontrol	7	510,934± 19,64 µm	23,199± 2,56 µm	2,804± 197 µm
DM	6	460,273± 14,6 µm	34,306± 3,14 µm	4,525± 275 µm
EP	5	512,594± 23,68 µm	28,62± 1,055 µm	2,945± 091 µm
DM+EP	7	491,014± 10,3 µm	29,4± 1,78 µm	3,047± 084 µm

4.3.2.İmmünohistokimyasal Bulgular

4.3.2.1.TUNEL Boyama Değerlendirmesi

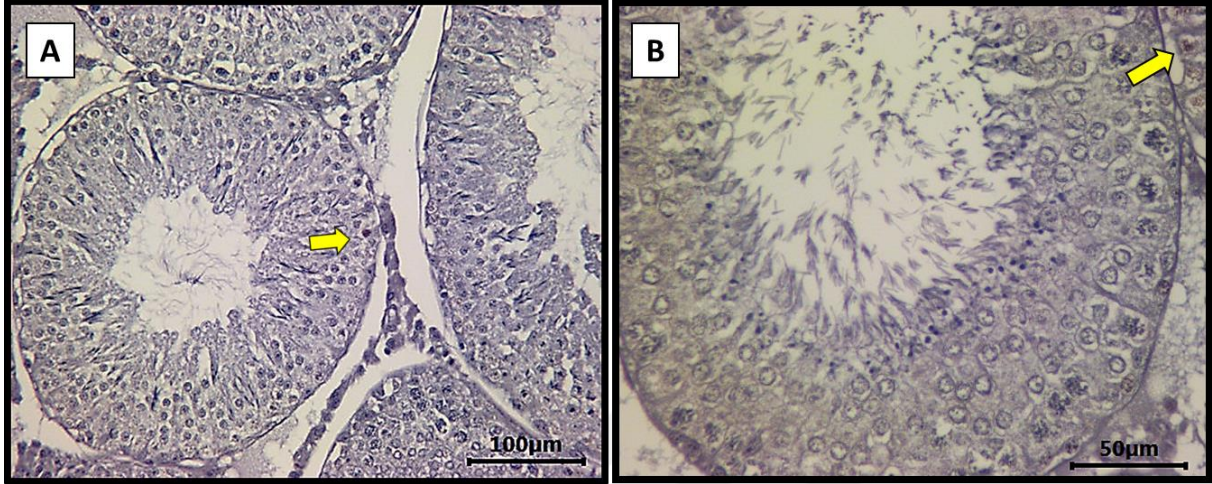
Deneklerden elde edilen testis kesitlerinde DNA hasarına sahip hücrelerin analizini yapmak için TUNEL boyama protokolü uygulandı. Image J programını kullanarak seminifer tübülleri değerlendirildi. Her preperatta 20x büyütmede, 10 ayrı tübül incelendi. Elde ettiğimiz verilere göre TUNEL pozitif (+) hücre sayısı ortalamaları; kontrol grubunda $2,857 \pm 340$, diyabet grubunda $28,166 \pm 749$, etil pirüvat grubu $9,600 \pm 1,07$ ve diyabet + etil pirüvat grubunda ise $17,285 \pm 944$ değerleri elde edildi.

Tüm gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; diyabet grubunda TUNEL (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0,0001$), Diyabet+ etil pirüvat grubunda TUNEL (+) hücre sayısının diyabet grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p = < 0,0001$). Etil pirüvat grubunda TUNEL (+) hücre sayısının diyabet grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0,0001$). Etil pirüvat grubunda TUNEL (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını belirlendi ($p < 0,0001$). Diyabet+ etil pirüvat ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TUNEL (+) hücre sayısının anlamlı olarak arttığını gözlemlendi ($p < 0,0001$). Etil pirüvat grubu ile diyabet+ etil pirüvat grubu karşılaştırıldığında ise TUNEL (+) hücre sayısının anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). (Şekil 34).



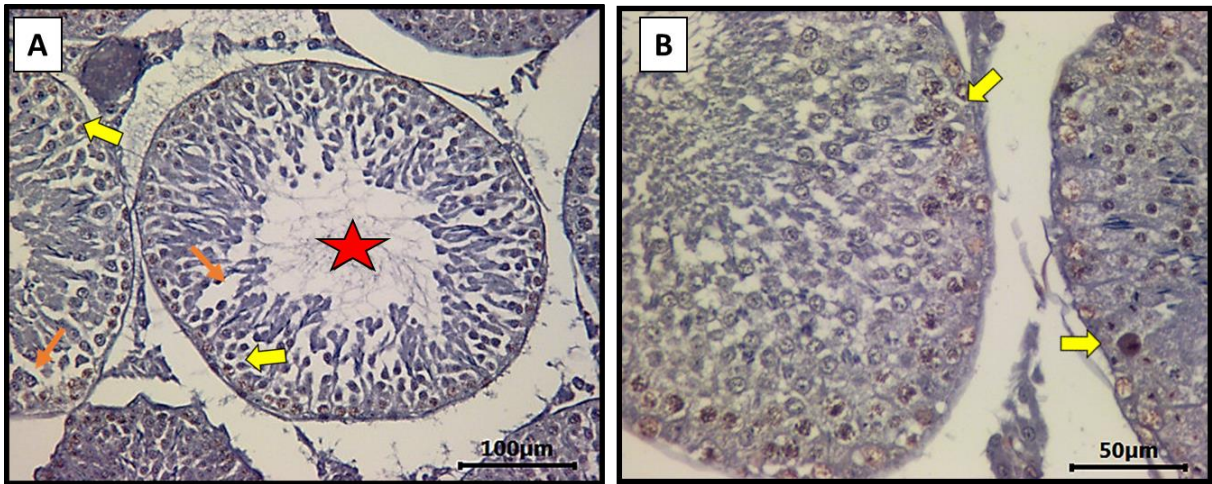
Şekil 34: TUNEL pozitif (+) hücre sayısı. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p < 0.05$). Diyabet grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p < 0.05$)

Kontrol grubu; kesitleri incelendiğinde, bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücrelerin olduğu tespit edildi. Histolojik verilerde olduğu gibi seminifer tübüllerin yapısının düzgün olduğu gösterilmektedir (Şekil 35).



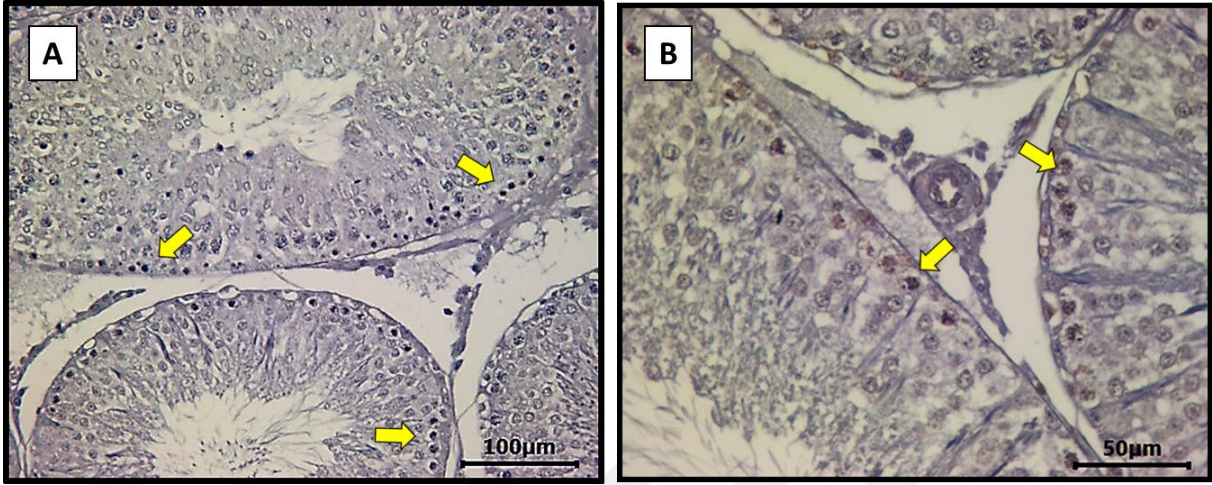
Şekil 35: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A;** 20x, **B;** 40x'lik görüntüleri gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

Diyabet grubu; kesitleri incelendiğinde, çok sayıda dejenere olmuş seminifer tübül varlığı ve çok miktarda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 36).



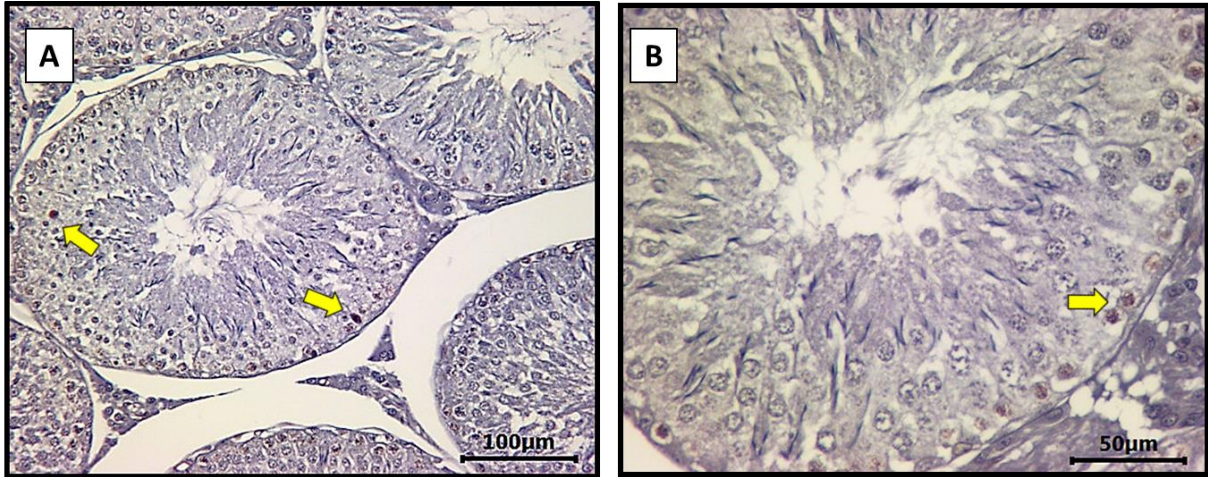
Şekil 36: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A;** 20x, **B;** 40x'lik görüntüleri gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir. Kahverengi ok (→) ile spermatogenetik hücrelerin arasındaki vakuolleşme gösterilmektedir. Kırmızı yıldız (★) ile seminifer tübül lümeninde bulunan azalmış spermiumlar gösterilmektedir.

Etil pirüvat grubu; kesitleri incelendiğinde, seminifer tübül yapısının düzgün olduğu ve kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 37).



Şekil 37: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A;** 20x, **B;** 40x’lik görüntüleri gösterilmektedir. Sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

Diyabet+ Etil Pirüvat Grubu; kesitleri incelendiğinde, apoptotik hücre varlığı gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin oranı, diyabet grubuna göre azaldığı belirlendi (Şekil 38).

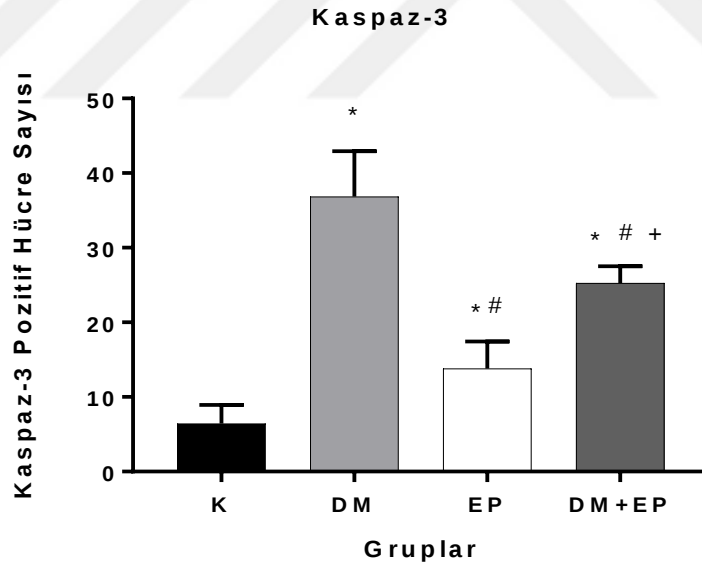


Şekil 38: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri. Testis kesitlerinin **A;** 20x, **B;** 40x’lik görüntüleri gösterilmektedir. Sarı ok(→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

4.3.2.2. Aktif Kaspaz 3 Boyama Değerlendirmesi

Testis dokularında apoptotik hücre varlığını göstermek için TUNEL boyamasına ek olarak Aktif Kaspaz-3 boyaması yapıldı. Değerlendirmeler Image J programı ile gerçekleştirildi. Elde edilen dokularda, her denek için 10 ayrı tübülde apoptotik hücre varlığını gözlemledik. Elde edilen sonuçlara göre Aktif Kaspaz-3 hücre sayıları ortalaması; kontrol grubunda $6,428 \pm 947$, diyabet grubunda $36,833 \pm 2$, etil pirüvat grubu $13,800 \pm 1$ ve diyabet + etil pirüvat grubunda ise $25,285 \pm 837$ olarak tespit edildi.

İstatiksel olarak gruplar değerlendirildiğinde; Diyabet, etil pirüvat ve diyabet+ etil pirüvat gruplarında Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (sırasıyla $p=0,0001$, $p=0,0019$, $p<0,0001$). Diyabet+ etil pirüvat grubu ile etil pirüvat gruplarının Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısının diyabet grubuna göre anlamlı olarak azaldığını saptadık ($p=0,0007$, $p<0,0001$). Etil pirüvat grubu ile diyabet+ etil pirüvat grubu karşılaştırıldığında Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısının anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,0001$). (Şekil39).



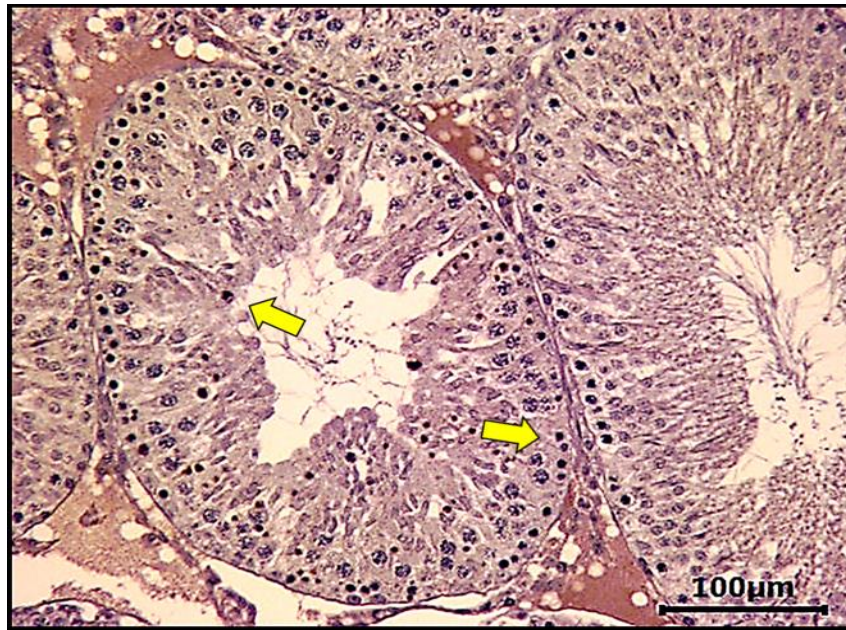
Şekil 39: Aktif kaspaz-3 değerlendirilmesi. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). Diyabet grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). Etil pirüvat grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar artı (+) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$).

Kontrol grubu; kesitleri incelendiğinde, bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücrelerin olduğu tespit edildi. Histolojik verilerde olduğu gibi seminifer tübüllerin yapısının düzgün olduğu gösterilmektedir (Şekil 40).



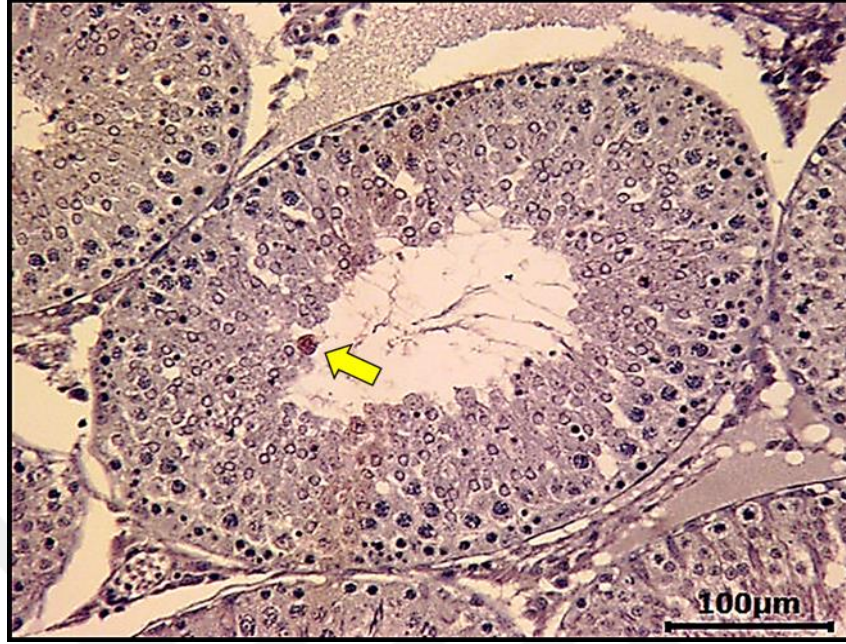
Şekil 40: Kontrol grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri. Testis kesitlerinde sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir (20x).

Diyabet grubu; kesitleri incelendiğinde, çok sayıda dejenere olmuş seminifer tübül varlığı ve çok miktarda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 41).



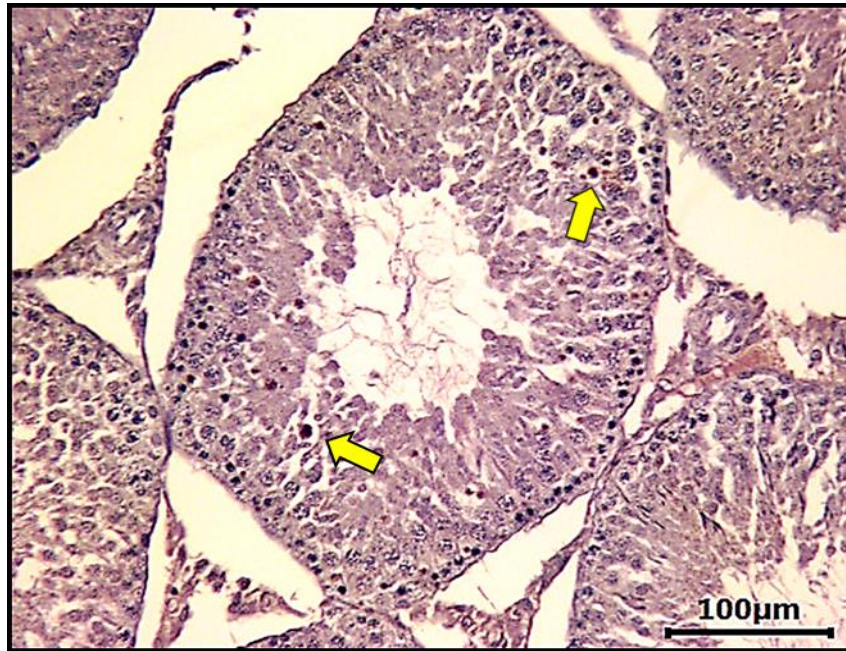
Şekil 41: Diyabet grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri. Testis kesitlerinde sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir (20x).

Etil pirüvat grubu; kesitleri incelendiğinde, seminifer tübül yapısının düzgün olduğu ve kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 42).



Şekil 42: Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri. Testis kesitlerinde sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir (20x).

Diyabet+ Etil Pirüvat Grubu; kesitleri incelendiğinde, apoptotik hücre varlığı gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin oranı, diyabet grubuna göre azaldığı belirlendi (Şekil 43).

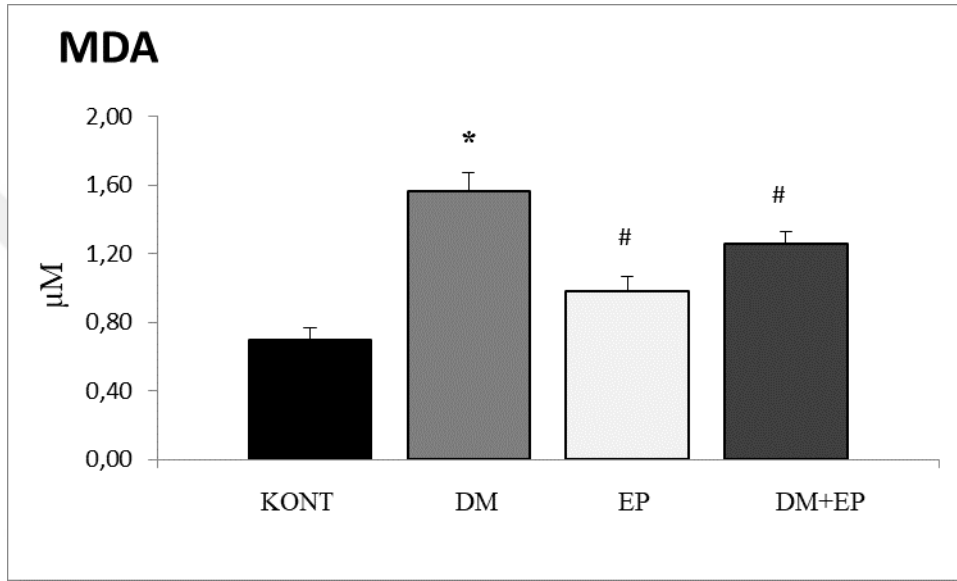


Şekil 43: Diyabet+ Etil pirüvat grubuna ait testisin histolojik (Kaspaz-3) görüntüleri. Testis kesitlerinde sarı ok (→) ile apoptotik hücreler gösterilmektedir (20x).

4.4.BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.4.1.MDA Düzey Değerlendirmesi

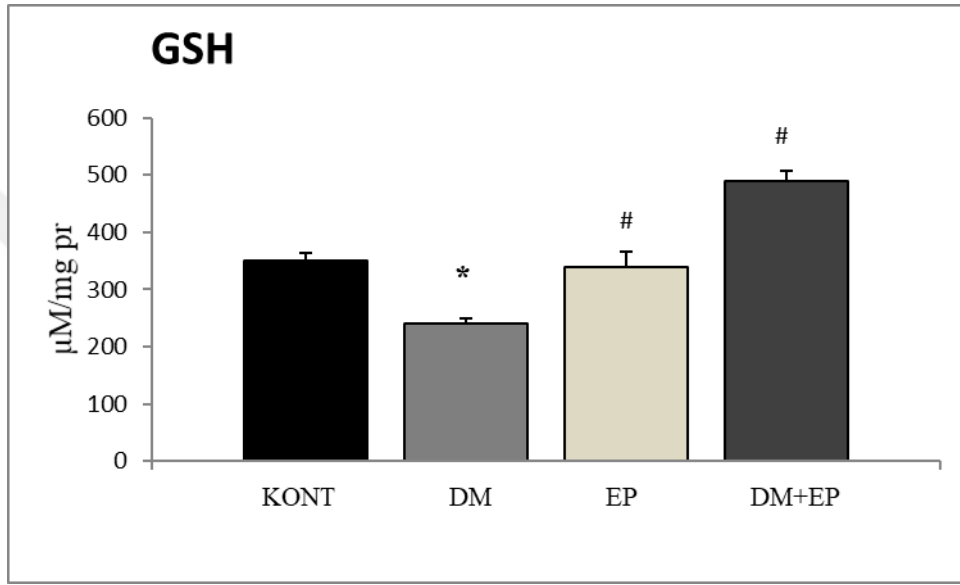
Tüm grupların MDA değerleri Tablo 8’de, ortalama MDA sonuçları Şekil 44’te gösterilmektedir. DM grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p=0.025$), EP grubunda MDA değerleri DM grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Kontrol grubuna göre EP ve DM+EP gruplarının MDA değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 44: MDA düzey değerlendirilmesi. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). DM grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$).

4.4.2. GSH Düzey Değerlendirmesi

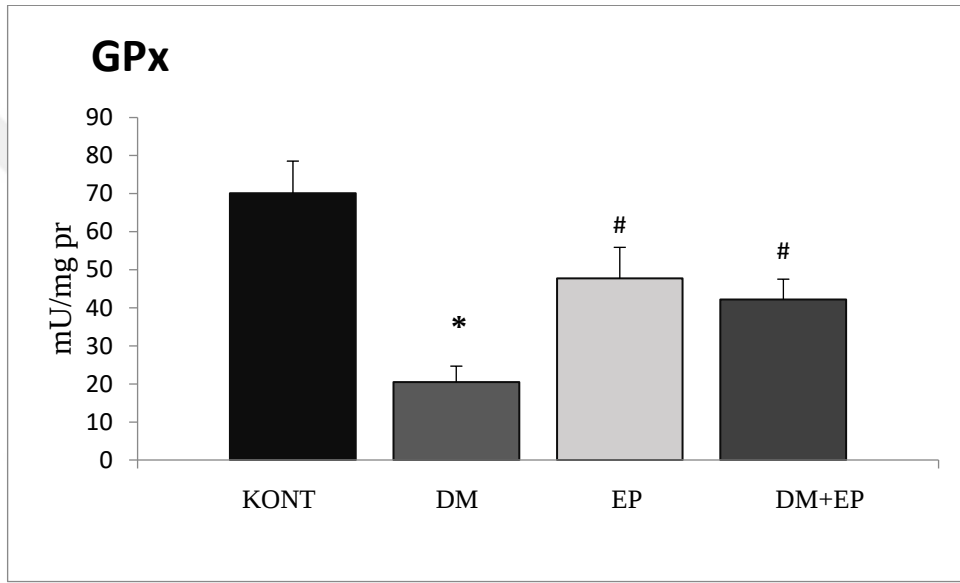
Tüm grupların GSH değerleri Tablo 8’de, ortalama GSH sonuçları Şekil 45’de gösterilmektedir. DM grubunda GSH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ($p<0.001$), DM+EP grubunda GSH değerleri DM grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$), EP grubu GSH değerleri DM grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.001$). Kontrol grubuna göre EP ve DM+EP gruplarının GSH değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 45: GSH düzey değerlendirme. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$). DM grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$).

4.4.3.GPx Düzey Değerlendirmesi

Tüm grupların GPx değerleri Tablo 8’de, ortalama GPx sonuçları Şekil 46’da gösterilmektedir. DM grubunda GPx değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ($p<0.001$), DM+EP grubunda GPx değerleri DM grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p=0.037$), EP grubu GPx değerleri DM grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.015$). Kontrol grubuna göre EP ve DM+EP gruplarının GPx değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 46: GPx düzey değerlendirme. Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar yıldız (*) simgesiyle ($p<0.05$). DM grubuna göre anlamlı olarak farklı olanlar kare (#) simgesiyle gösterilmektedir ($p<0.05$).

Tablo 8: MDA, GSH, GPX değerleri

Grup	n	MDA (µM)	GSH (µM)	GPx mU/mg pr
KONT	7	0.69 ± 0.07	349.23 ± 14.60	70.14 ± 8.40
DM	6	1.56 ± 0.10*	240.51 ± 8.56*	20.47 ± 4.19*
EP	5	0.98 ± 0.08#	339.33 ± 25.77#	47.72 ± 8.16#
DM+EP	6	1.26 ± 0.06#	489.46 ± 18.01#	42.18 ± 5.34#

5.TARTIŞMA

Deneysel olarak oluşturulan diyabet modelinde, etil pirüvat'ın sıçan testisine etkisi ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmada 28 adet (10-12 haftalık) wistar albino erkek sıçanları kullanıldı. Denekler eşit sayıda olacak şekilde (n=7) 4 farklı gruba ayrıldı. Bu gruplar; kontrol grubu, diyabet grubu, etil pirüvat grubu, diyabet + etil pirüvat grubudur. Kontrol grubu; deneklere hiçbir uygulamanın yapılmadığı gruptur. Diyabet grubu; deneklere ilk gün tek doz i.p yolla 45mg/kg STZ verilen gruptur. Etil pirüvat grubu; deneklere 14 gün boyunca günde iki defa i.p yolla 50mg/kg etil pirüvat verilen gruptur. Diyabet + etil pirüvat grubu ise deneklere ilk gün i.p yolla tek doz 45mg/kg STZ verildikten sonra 3. günde kan glikoz değerlerine bakılarak 250mg/dl'nin üzerindeki kan/glikoz değerine sahip deneklere, 14 gün boyunca günde 2 defa i.p yolla 50mg/kg etil pirüvat verilen gruptur. Tüm denekler 18. günde kurban edilerek elde edilen testis dokularından, sağ testisi histolojik, sol testis biyokimyasal incelemelerde kullanıldı.

Bu grupların sonuçlarının yorumlanmasında; histokimyasal ve morfolometrik incelemeler için sağ testiste hematoksilin-eozin, Masson Trikrom, PAS boyama yöntemi, immünohistokimyasal incelemeler için aktif kaspaz-3 ve TUNEL boyamaları kullanıldı. Biyokimyasal incelemeler için GSH, GPx ve MDA düzeyleri ölçüldü.

Vücut ve testis, ağırlığı yönünden yapılmış olan çalışmalar değerlendirildiğinde; Bal ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada testis, epididim, sağ kauda epididimi, seminal vesiküller ve prostatın mutlak ve göreceli organ ağırlıklarını ölçmüşlerdir. Göreceli (bağıl) organ ağırlığını ve mutlak organ ağırlıklarını vücut ağırlığına bölerek tahminlerde bulunmuşlardır. Bu sayede çalışmalarında kontrol grubuna göre STZ grubundaki vücut ve testis ağırlıklarının düşük olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca epididim ve sağ kauda epididimi seminal vezikül ve prostatın mutlak ağırlıkları ile sağ kauda epididimis, seminal veziküller ve prostatın göreceli ağırlıklarının kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede düşük olduğunu elde ettikleri verilerle açıklamışlardır (65). Roy ve ark. (2013) farklı sıçan gruplarının vücut ağırlık değişikliklerinin karşılaştırılması ile STZ ile muamele edilen sıçanların vücut ağırlığında anlamlı derecede azalma gösterdiğini gözlemlemişlerdir. STZ uygulandıktan 21 gün sonra antioksidan ve anti-inflamatuar özellikteki naringenin ile tedavi edilen grupların, farklı sıçan gruplarına yönelik yapılan kıyasla STZ ile muamele edilen sıçanların vücut ağırlıklarında azalma gözlemlendi. Ayrıca sadece naringenin uygulanan gruplarda kontrol grubuna benzer

vücut ağırlığını belirlemişlerdir (66). Amaral ve ark. (2008) deneklerdeki vücut ve üreme organlarının ağırlıklarına baktıklarında, diyabet olan hayvanların kontrol grubundaki sıçanlara kıyasla vücut ve üreme organlarının ağırlığında önemli bir kayıp olduğunu gözlemlemişlerdir (67). Roslan ve ark. (2016) yaptıkları deneyde, diyabetik sıçanlarda 28. gündeki vücut ağırlığının ilk gün ki vücut ağırlığına kıyasla belirgin bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir (68). Akkoc ve ark. (2012) diyabetik grupta 214 ± 3.7 g olan ortalama vücut ağırlığı diyabetik olmayan gruptaki sıçanlarda; 303 ± 7.1 g olarak ölçmüşlerdir. Vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında diyabetik olan gruptaki deneklerin ağırlıkları, diyabet olmayan gruptaki deneklere oranla anlamlı derece düşük olduğunu tespit etmişlerdir (18). Guneli ve ark. (2008) Diyabetik olmayan ve diyabetik gruplarda vücut ağırlık değerleri sırasıyla 300-15.9 ve 218-15.6 g olarak bulmuşlardır. Sakrifikasyon günü; diyabetik hayvanlar ile diyabetik olmayan hayvanların vücut ağırlıkları karşılaştırdıklarında, diyabetik olan hayvanlarda daha düşük bir vücut ağırlığı belirlemişlerdir (4). Kanter ve ark. (2012) yaptıkları deneyde, gruplar arasında ortalama testis ağırlıkları ve vücut ağırlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlemişlerdir (15). Yaptığımız çalışmada deneklerin ilk ve son vücut ağırlıklarını ölçüldü. Kontrol, diyabet ve etil pirüvat grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak diyabet+ etil pirüvat grubunun, kontrol grubuna göre vücut ağırlık ortalamalarında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

Kan glikoz seviyeleri açısından çalışmalar değerlendirildiğinde; STZ, insülin salınımında ve hiperglisemide bir azalma gerçekleştirerek, beta hücre kütlesinin hızla tükenmesine neden olarak diyabete yol açar (69). Roy ve ark. (2013) Amaral ve ark. (2008) Akkoc ve ark. (2012). Guneli ve ark. (2008), Dönmez ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarda, diyabetik grubun kontrol grubuna kıyasla kan glikoz düzeyinde belirgin olarak daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (4,12,18,66,67). Biz de deneyin başlangıcında, deneyin 3. ve sakrifikasyondan işleminden önce sıçanların kuyruk veninden alınan kandan, kan glikoz değerlerini ölçtük. STZ ile indüklenen sıçanlarda kan glikoz değerlerinin 250 mg/dl üzerinde olduğunu, kontrol grubuna kıyasla kan glikoz düzeyinde belirgin olarak daha yüksek olduğunu tespit ettik.

Histolojik değişiklikler açısından yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; Amaral ve ark. (2009), STZ uygulanan sıçanlarda, kontrollere kıyasla daha küçük tübül çapına sahip olduklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, STZ uygulanan sıçanlarda, vakuolizasyon, spermatogenetik seri hücrelerinde eksiklik, çok çekirdekli hücrelerin ve dejenere hücrelerin

varlığı gibi değişiklikleri içeren tübüllerin sayısını, daha yüksek olarak belirtmişlerdir. Ayrıca, STZ uygulanan grupta dejenere epitel varlığını gözlemlemişlerdir (67). Ding ve ark. (2016) deneklerin histolojik değerlendirmesinde, diyabetik sıçanların seminifer tübülünde bozulma, seminifer tübül lümenindeki spermatidlerin yok olması ve Leydig hücrelerinin azalma veya kaybı olduğunu gözlemlemişlerdir (70). Guneli ve ark. (2008) kontrol grubunda seminifer tübül hücre serisinin mevcut olduğunu, diyabetik sıçanlarda seminifer tübül yapısının bozuk ve spermatogenetik hücre serisinde de önemli bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir (4). Bal ve ark. (2011) kontrol grubuna kıyasla STZ grubundaki deneklerin testisinde dejenerasyon, deskuamasyon, düzensizlik, germinal hücrelerde azalma, intersitisyel ödem değişikliklerini gözlemlemişlerdir. Seminifer tübül çapı, germinal hücre tabakası kalınlığı ve Johnsen skorlaması yönünden karşılaştırıldığında STZ grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca diyabetik sıçanlara antioksidan olarak bilinen hidratlı C60 fullerene (C60HyFn) verilmesiyle, testiküler histolojik görünüşte belirgin düzelmeye neden olduğunu göstermişlerdir. Germinal düzensizlik, intersitisyel ödem hariç, diyabet ile indüklenen histopatolojik değişikliklerde azalma gözlemlenmiştir (65). Roy ve ark. (2013) diyabet olan sıçanlarda, seminifer tübül yapısında gerçekleşen bozulma, spermatogonia, sertoli hücreleri, primer spermatositler, spermatidler gibi spermatogenetik hücre serilerinin sayısında belirgin bir azalma olduğunu, ayrıca diyabet grubunda birçok seminifer tübül lümeninde atipik hücrelerin ve interstisyel bölgede şiddetli ödem varlığını belirlemişlerdir. Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında naringenin ile tedavi edilen grupta seminifer tübül yapısının düzeldiği, spermatogenetik hücrelerde ve Leydig hücrelerinde diyabete oranla düzelmeyen olduğunu tespit ettiklerini belirtmektedirler (66).

Bizim çalışmamızda; kontrol grubunda seminifer tübül çaplarının ve seminifer tübül yapısı normal, spermatogenetik seri hücreleri düzenliydi. Diyabet grubunda ise yer yer seminifer tübül çaplarında azalma, seminifer tübüllerin yapısında bozulma ve seminifer epitellerinde kayıp olduğunu gördük. Bazı seminifer tübüllerin içinde vakualizasyon, çok çekirdekli hücre, seminifer tübül lümeninde hücre kalıntıları ve bazal membran ile spermatogenetik hücre arasında ayrışmanın gerçekleştiğini, bazı tübüllerde ise spermiyum kayıplarını tespit ettik. İnterstisyel alanda ise bağ dokuda artışı saptadık. Diyabet+etil pirüvat grubu, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında diyabetin oluşturduğu hasarın azaldığını ve kontrol grubuna yakın bir görünüm sergilediğini gözlemledik.

Periyodik Asit-Schiff boyama yöntemiyle seminifer tübül bazal membran (STBM) kalınlıkları değerlendirildiğinde; Guneli ve ark. (2008) kontrol STBM'nin normal olduğu, kontrol ile diyabet grubu karşılaştırıldığında STBM kalınlığında belirgin bir artışın olduğunu göstermişlerdir (4). Fatani ve ark. (2015) diyabet grubunda bazal membranın belirgin kalınlaşma saptamışlardır (11). Biz de, kontrol grubu ile diyabet grubunu karşılaştırdığımızda diyabet grubunda bazal membranda kalınlaşma meydana geldiğini gösterdik. Diyabet+ etil pirüvat grubunda diyabet grubuna göre kalınlaşmanın azaldığını ve kontrol grubuna yakın bir değer gösterdiğini tespit ettik ($p=0,0002$). Etil pirüvatın diyabette oluşan bazal membran kalınlaşmasını azalttığını bulduk.

Seminifer tübül çapı ve Johnsen kriterleri yönünden yapılan çalışmalarda; Guneli ve ark. (2008) seminifer tübül çapı ve Johnson'un kriter değerlerinin, diyabetik sıçanların kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı belirtmişlerdir. Ayrıca, diyabetik sıçanlara kıyasla, melatonin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda anlamlı şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Melatonin grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır (4). Fatani ve ark. (2015) kontrol grubunda germinal hücrelerin spermatidlere ve sperm olgunlaşmasına kadar tam olduğu, diyabet grubunda spermatogenetik hücreler, tübüllerin çoğunda dejenerasyon gösterirken diğer gruplarda ise dejenerasyon daha az olarak görülmüştür. Ayrıca, diyabet grubunda olgunlaşmanın primer spermatogonia'ya kadar olduğu gözlemlemişlerdir. İnterstisyel alanın ödemli ve çok sayıdaki kan damarlarının duvarında kalınlaşma, genişleme ve tıkanma olduğunu saptamışlardır. Antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri olan luteini diyabetli hayvanlarda farklı dozlarda uygulamışlardır. Lutein uygulanan diyabet gruplarında seminifer tübüllerdeki dejenerasyonda azalma, spermatogenetik hücrelerin sayısında artışın olduğu ve interstisyel alanda ödem ile kan damarlarının duvarlarındaki kalınlaşmanın azaldığını gözlemlemişlerdir (11). Dönmez ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada diyabet grubundaki ortalama seminifer tüp çapının değerinin kontrollerden anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır. Ayrıca vakuolizasyon ve spermatogenetik seri hücrelerindeki dejenerasyon, seminifer tübüllerin değişik derecelerde spermatogenez durması ve atrofi olduğunu saptamışlardır (12). Golalipour ve ark. (2011) diyabetik grupta seminifer tübüllerin çoğunda tübüler hücrelerin parçalanması, sertoli ve spermatogonia hücrelerinin vakuolizasyonunun gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Koruyucu grubuna ait histopatolojik bulguların kontrol grubuna benzer olduğunu ancak tunika albuginea ve fibröz dokuda kalınlık artışının devam ettiğini belirtmişlerdir (13). Kanter ve ark. (2012) kontrol grubunda normal

testis yapısı ve normal spermatogenetik seri hücrelerine sahip seminifer tübüllerin varlığını göstermişlerdir. Diyabetik sıçanların testisinde ise epitelin morfolojisinde ciddi şekilde bozulma olduğunu ve seminifer tübüllerin çapında azalma tespit etmişlerdir. Antioksidan olan quercetin (QE) ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda spermatogenetik hücrelerin sayısında artış olduğu, diyabetik grupla kıyaslandığında ise seminifer tübül yapısında iyileşme olduğunu belirtmişlerdir (15). Biz de çalışmamızda diyabetin testis dokusunda, seminifer tübül çapı ve seminifer tübül organizasyonunda hasar oluşturduğunu ancak istatistiğe yansıyan bir azalma olmadığını gördük. Bunun sebebi seminifer tübül etkilenmesinin DM'ye maruz kalma süresi ile ilgili olabilir. Süre arttıkça etkilenme oranı da artabilir. Diyabet+ etil pirüvat grubu ile diyabet grubunu kıyasladığımızda, diyabet+ etil pirüvat grubunda seminifer tübülün organizasyonunda ve çapında iyileşmelerin olduğunu tespit ettik. Ayrıca interstisyel alanda da Leydig hücreleri, bağ doku hücreleri, kan ve lenf damarları bulunduğunu ve bunların bir bütünlük gösterdiğini gözlemledik. Bu bilgiler ışığında, STZ ile indüklenen diyabetli sıçanların, testis dokusunda oluşan yapısal hasara karşı etil pirüvatın tedavi edici etkisinin olduğunu saptadık.

Oksidatif stres, normal fizyolojik koşullar altında oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan ürünlerin varlığıdır. Ancak antioksidan sistemler tarafından ortadan kaldırılmadığında zararlı hale gelmektedir (71). STZ kaynaklı diyabetik sıçanlarda ROS artışının gözlenmesiyle birlikte oksidatif stres oluşur (66). Oksidatif stres, diyabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynamaktadır (72). Belirli enzimler, antioksidan savunmada oksidatif strese karşı koruyucu bir mekanizma olarak rol oynamaktadır. Bu enzimlere SOD, glutatyon peroksidaz ve serbest radikalleri veya reaktif oksijen ara ürünlerini radikal olmayan ürünlere dönüştüren katalaz dahildir. Önceki çalışmalar, SOD, katalaz ve GSH'ın erkek üreme organlarında zararlı ROS'u temizleyen büyük enzimler olduğunu belirtmektedir (73). Roy ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada; diyabetli sıçanlarda, testis dokusunda SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin azaldığını ve bu değerlerin kontrol grubuna göre anlamlı derecede olduğunu belirtmişlerdir (66). Akkoc ve ark. (2012) karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada; çalışma gruplarının MDA düzeylerini karşılaştırdıklarında, kontrol ve EP grubuna kıyasla diyabetik grubun anlamlı olarak daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. EP ile tedavi edilen grupta ise MDA seviyesi, diyabetik grup ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşük olduğunu tespit etmişlerdir (18). Kanter ve ark. (2012); STZ ile indüklenen diyabet grubunun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA

düzeylerinde belirgin artışlara neden olduğunu saptamışlardır. Antioksidan olan QE ile tedavi edilen grubun, diyabetik gruba kıyasla lipid peroksidasyonunda anlamlı bir düşüş oluşturduğunu belirtmişlerdir. GSH, GPx ve SOD antioksidan enzim aktiviteleri için diyabet grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, diyabet grubunda anlamlı derecede az olduğunu gözlemlemişlerdir. QE ile tedavi edilen diyabetik grupta, diyabetik gruba göre GSH, GPx ve SOD aktivitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir (15). Çalışmamızda diyabet grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, diyabet grubunun MDA değerleri diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı bulundu. Etil pirüvat grubu ve diyabet+ etil pirüvat grubunu, kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark görülmedi. GSH ve GPx analiz değerlerine bakıldığında ise; diyabet grubunun kontrol grubuna göre anlamlı derece düşük olduğunu belirledik. Etil pirüvat uygulanan sıçanların, enzim düzeylerinde artış olduğunu gözlemledik. Diyabet grubunda MDA değerlerinin yüksek olmasının diyabetin testis dokusunda oksidatif hasara yol açtığını gösterdi. EP grubunda kontrole yakın değerlerin alınması, EP'nin oksidatif hasar oluşturmadığı, ayrıca DM'de verildiğinde oksidatif hasarı azalttığını gösterdi. Bunu da GSH ve GPx düzeylerini artırarak gerçekleştirdiğini düşündük.

TUNEL ve kaspaz-3 boyamaları yöntemiyle elde edilen veriler ile ilgili literatür taramasında; Bal ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada TUNEL pozitif hücreler kontrol grubuna göre diyabetik sıçanlarda testiste belirgin olarak artmıştır. TUNEL pozitif hücreler spermatogenetik hücrelerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, C60HyFn tedavi edilen diyabetik sıçanların testisinde STZ grubuna göre TUNEL pozitif hücrelerinin sayısında belirgin bir düşüş gözlemlemişlerdir (65). Roy ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada; kontrol grubunda TUNEL pozitif hücrelerinin oranının genellikle çok düşük olduğunu ve diyabet grubundaki testis kesitlerinde ise daha çok pozitif boyanma ile ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuar madde olan naringenin ile tedavi edilen gruplarda ise diyabet grubuna göre daha az TUNEL pozitif hücrelerin varlığını saptamışlardır (66). Bahey ve ark. (2014) prostat dokusunda yaptıkları çalışmada; kontrol grubundan elde edilen kesitlerin immünohistokimyasal boyanmasında az miktarda aktif kaspaz-3 immünreaktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Diyabetik grupta kontrol grubuna oranla artmış sayıda pozitif epitel hücresi olduğunu gözlemlemişlerdir (74). Guneli ve ark. (2008) yaptıkları çalışmalarında; kontrol grubundaki TUNEL pozitif hücrelerin sayısını ihmal edilebilir olduğunu belirtmişlerdir. Güçlü bir antioksidan olan melatonin uygulanan grupta ise TUNEL pozitif hücrelerin nadiren gözlemlendiğini saptamışlardır. Melatonin ile tedavi edilen diyabetik grupta, TUNEL-pozitif

hücre sayısının diyabetik gruba göre azalma gösterdiğini ve kontrol grubuna kıyasla belirgin bir değişikliğin saptanmadığını belirtmişlerdir. Diyabetik grupta, seminifer tübüllerde spermatogenetik tüm hücre serilerinde TUNEL pozitif hücrelerini gözlemlemişlerdir (4). Kanter ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada; kontrol grubunda sadece birkaç TUNEL pozitif hücre saptamışlardır. Ancak, diyabetik grupta TUNEL pozitif germ hücrelerinin, sayısında ve sinyal yoğunluğunda önemli derecede artmış olduğunu belirtmişlerdir. Antioksidan olan Quercetin (QE) ile tedavi edilen diyabetik grupta apoptotik indeks diyabetik gruba göre anlamlı olarak azalma gösterdiğini gözlemlemişlerdir (15). Biz de çalışmamızda testis dokusundaki, apoptotik hücre varlığını tespit etmek için TUNEL ve Kaspaz-3 protokollerini uyguladık. Kontrol grubuna göre diyabet grubunda apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemledik. Diyabet+ etil pirüvat grubu, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalmanın olduğunu gözlemledik. Bu verilere dayanarak diyabette meydana gelen hücre hasarı ile birlikte artan apoptozu etil pirüvatın azalttığını, hücresel düzeyde düzelmede rol oynadığı sonucuna vardık. Bu etkisi antioksidan özelliğine bağlı olarak diyabette artan serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türlerinin miktarını azaltarak gerçekleştirmiş, bu sayede apoptoza giden hücre sayısında azalma meydana gelmiş olabilir.

Etil Pirüvat üzerine Tawadrous ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada hemorajik şok modelinde, etil pirüvat'ın organ hasarına karşı iyileştirici etkileri olduğunu görmüşlerdir (75). Park ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada etil pirüvatın anjiyogenez ilişkili inflamasyon, sepsis, hemorajik şok, pıhtılaşma ve iskemi/reperfüzyon dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların, tedavisi için yararlı olabilecek güçlü bir anti anjiyogenik aktiviteye sahip olduğunu, tümör anjiogenezisi ve inflamasyonu düzenleyerek, tümör büyümesi ve anjiogenezini sınırladığını belirtmişlerdir (76). Kung ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada lipopolisakkarit uygulamasında oluşturulmuş yaygın intravasküler koagülasyonu etil pirüvatın anti-inflamatuar etkisine bakmışlar ve etil pirüvatın tedavi edici etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (77). Yang ve ark. (2012); yüksek doz acetaminophen ile yaptıkları uygulamada, karaciğer inflamasyonuna karşı etil pirüvatın erken dönemde, koruyucu etkisinin olduğunu ancak uzun dönem anti-inflamasyonla tedavisinin faydalı olmadığını belirtmişlerdir (78). Kaklıkkaya ve ark. (2010); çalışmalarında akciğer dokusunda etil pirüvatın, lipid peroksidasyonunda azalma ve buna bağlı akciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (16). Salahudden ve ark. (1991); yaptıkları deneysel çalışmada, sıçanlar üzerinde sodyum pirüvat solüsyonunun böbrek

yetmezliğini önlediğini göstermişlerdir (79). Payabvasha ve ark. (2008); etil pirüvatın sistemik ve yüksek dozlarda kullanımının testis torsiyonunda oluşturduğu malondialdehit ve apoptotik indeksleri düşürdüğü ve buna bağlı olarak hücre hasarı azalttığını belirtmişlerdir. Ayrıca, çalışmanın 1. ayından sonra, etil pirüvatın antiapoptotik etkenine bağlı olarak, sperm sayısında ve hareketliliğinde bir iyileşme tespit etmişlerdir (80). Akkoc ve ark. (2012) diyabetik model karaciğerinde yaptıkları çalışmada diyabetik sıçanlarda; granüler dejenerasyon, hepatosit trabeküller bozulması, mikrovaküolizasyon, makro-vakuolizasyon ve inflamasyon gibi histopatolojik değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Kontrol ve EP grubunda ise hepatositlerin elektron mikroskopik incelemesinde yapısal olarak normal çekirdekler ve hücre organelleri gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, diyabetik sıçanların hepatositlerinde mitokondriyal şişme ve kristaloliz, endoplazmik retikulumda genişleme, otofajik vakuollerin ve lipid granüllerinin artışı gibi dejeneratif değişiklikleri tespit etmişlerdir. Ayrıca, hepatositlerin sitoplazmalarında glikojen birikimini gözlemlememişlerdir. Diyabetik grup örneklerinde görülen dejenerasyon bulguları, EP tedavisi gören diyabetik grupta daha az olduğunu gözlemlemişlerdir. EP ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda ise hepatositlerin sitoplazmasında glikojen depolanmalarını tespit etmişlerdir (18).

Biz de çalışmamızda, etil pirüvatın diyabet sonucu testis dokularında oluşan, bazal membran kalınlaşmasında, spermatogenetik hücrelerdeki apoptotik hücrelerin sayısında ve MDA değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı azalmanın olduğunu gözlemledik. Ayrıca Johnsen skorlamasına göre kontrol grubuna yakın değerler göstermesi ve GSH, GPx değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış göstermesi bize EP'nin oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan hasarda tedavi edici özelliğinin olduğunu gösterdi.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda STZ ile oluşturulan diyabet modelinin testis dokusunda hasara yol açtığını göstermiştir. Deneklerde diyabetin oluşmasıyla beraber dokudaki oksidatif stress ve ROS türevlerinin seminifer tübüllerde hasara yol açtığını, buna bağlı olarak spermatogenetik seri hücrelerinin apoptoza girdiğini tespit ettik.

Diyabet modeliyle testis dokusunda oluşturulan hasarı seminifer tübüllerde ve interstisyel aralıkta histolojik ve immünohistokimyasal olarak belirledik. Bazal membran kalınlığının, spermatogenetik seri hücrelerindeki apoptozun Etil Pirüvat tedavisi ile azaldığını ve seminifer tübül çapında kontrol grubuna benzer bir yapı gösterdiğini, böylelikle dışarıdan verdiğimiz antioksidanın diyabet modeliyle oluşan hücresel hasarda tedavi etkisi olduğunu tespit ettik. Ayrıca doku enzim değerlendirmeleriyle Etil Pirüvatın diyabetle meydana gelen testis hasarını oksidan/antioksidan dengesini antioksidan lehine geliştirdiğini bulduk.

Literatürde STZ ile indüklenmiş diyabet modelinin testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı Etil Pirüvat'ın etkisinin gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Testis dokusunda diyabetle oluşan hasara karşı Etil Pirüvat'ın koruyucu etkileri ilk defa çalışmamızda histokimyasal ve morfometrik olarak Hematoksilen-Eozin, Masson-Trikrom ve PAS boyamaları ile, immünohistokimyasal olarak TUNEL ve Kaspaz-3 boyamaları yapılarak tespit edildi. Ayrıca biyokimyasal olarak MDA, GSH ve GPx ile de Etil Pirüvat'ın etkisi gösterildi.

Bu bilgiler ışığında, deneysel olarak oluşturulan diyabet modelinin sıçan testis dokusunda oluşturduğu hasarda Etil Pirüvat uygulamasının, gelecekte umut verici bir tedavi yöntemi olabileceği gösterildi. Ancak bunun için destekleyen daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla birlikte tedavi öncesi ve sonrası spermiyumun yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi de elde edilen verileri güçlendirecektir.

7.KAYNAKLAR

1. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. Genel Tıp Derg. 2007;17(4):231–236.
2. William, B. 2003. Hypertansion in diabetes. İlk baskı. London, Martin Dunitz Taylor& Francis Group
3. İrer SV, Alper G. Experimental models of diabetes mellitus, Türk Klinik Biyokimya Derg. 2004; 2(3): 127-136.
4. 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):354–360. doi:10.1159/000118032.
5. www.turkdiab.org. 05.2016
6. www.tdhd.org. 05.2016
7. La Vignera S, Condorelli RA, Di Mauro M, vd. Reproductive function in male patients with type 1 diabetes mellitus. Andrology. 2015;3(6):1082–1087. doi:10.1111/andr.12097.
8. Schoeller EL, Schon S, Moley KH. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. Cell Tissue Res. 2012;349(3):839–847. doi:10.1007/s00441-012-1387-7.
9. Öztürk, F, Gül, M., Ağkadir, M., Yağmurca, M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler: T Klin J MedSci. 2002; 22:173-178.
10. Jangir R, Jain G. Diabetes Mellitus Induced Impairment of Male Reproductive Functions: A Review.CurrDiabetesRev.2014;10(3):147–157.doi:10.2174/1573399810666140606111745.
11. Fatani AJ, Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, Al-Assaf A, Parmar MY, Ahmed MM. Lutein Dietary Supplementation Attenuates Streptozotocin-induced testicular damage and oxidative stress in diabetic rats. BMC Complement Altern Med. 2015;15(1):204. doi:10.1186/s12906-015-0693-5.
12. Bozdemir Donmez Y, Kizilay İi G, İii T-T. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. 2014;29(2910):2014–2645.doi:10.1590/S0102-8650201400160004.
13. Golalipour MJ, Balajadeh BK, Ghafari S, Azarhosh R, Khori V. Protective effect of Urtica dioica L. (Urticaceae) on morphometric and morphologic alterations of seminiferous tubules in STZ diabetic rats. Iran J Basic Med Sci. 2011;14(5):472–477.

14. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokim Derg.* 2006;31(April):51–56.
15. 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):719–725. doi:10.1016/j.fct.2011.11.051.
16. Kaklıkkaya I, Menteşe Ü, Koramaz I, vd. Deneysel iskemi reperfüzyon modelinde, etil pirüvat uygulamasının sonuçları. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;18(4):310–314.
17. Olek RA, Ziolkowski W, Flis DJ, vd. The effect of ethyl pyruvate supplementation on rat fatty liver induced by a high-fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2013;59(3):232–237. doi:10.3177/jnsv.59.232.
18. Akkoc H, Kelle I, Tunik S, vd. Protective effect of ethyl pyruvate on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012;75(3):336–341.
19. Yang Z-Y, Ling Y, Yin T, vd. Delayed ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe acute pancreatitis via reduced serum high mobility group box 1 levels in rats. *World J Gastroenterol.* 2008;14(28):4546–4550. doi:10.3748/wjg.14.4546.
20. Gartner L.P, Hiatt J.L (Çeviri: Dağdeviren A, Müftüoğlu F.S, Karabay G) *Renkli Histoloji Atlası. Güneş Kitapevleri 4. Baskı, s. 369-374.*
21. Ross MH, Pavlina W (Çeviri: Baykal B) *Histoloji 6. Baskıdan çeviri Palme Yayıncılık 2014; 784-828.*
22. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji. 10. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2006.*
23. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. In: Özgünen T, editors. *Vander insan fizyolojisi, Güneş Kitapevleri, 13. baskı, s. 603-622.*
24. Moore KL, Persaud TVN. *İnsan Embriyolojisi 8. Baskıdan çeviri; Nobel tıp yayınları 2008; 262-273.*
25. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara. Palme Yayıncılık, 2006: 531-564.*
26. Sadler TW (Çeviri: Başaklar C). *Langman’s Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık 1996; 273-4.*
27. Carlson MB. *Human Embryology and Developmental Biology. 4rd. Ed. China, Mossby, 2009.*
28. William KO, Patrick CN. Müftüoğlu S, Kaymaz S, Atilla P, editors. *Netter Temel Histoloji Saunders Elsevier, Güneş Kitapevleri 2009: 377-99.*
29. Yıldırım M, *İnsan Anatomisi, s. 226-236, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2003.*

30. Gilroy AM. In: Denk CC, editors. Anatomi temel ders kitabı, Palme yayıncılık, s. 117-119.
31. Gökmen FG, İçten N. Sistematik Anatomi. 1. Baskı. İzmir: İzmir Güven Kitabevi, 2003;531-546.
32. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. baskı. 1. cilt. Ankara, Güneş Kitabevi, 2001.
33. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. 4. baskı. Ankara, ODTÜ Yayıncılık, 2008.
34. Paker Ş. Histoloji. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990; s. 448-467.
35. Erkoçak A. Genel Histoloji. İzmir: 1984; s. 138-160.
36. Seçkin İ, Ertürkoğlu AŞ, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. Özel histoloji ders kitabı, İstanbul Üniversitesi yayın no: 4749, Fakülte yayını no:262, s. 156-167
37. Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations. 12. Edition. Ankara: Palme Yayıncılık, 2013, s. 477-501.
38. Anafarta K, Bedük Y. Temel üroloji-ürogenital sistemin fizyolojisi. 1. Baskı. İstanbul: Güneş Kitabevleri, 1998; s. 36-69.
39. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi fizyoloji. Ankara: Nobel Kitap evi, 2005;200-456
40. William B. Hypertansion in diabetes. İlk baskı. London, Martin Dunitz Taylor& Francis Group; 2003, s.151.
41. Buzlu S. (2002). Diyabetin psikososyal yönü. Erdoğan S.(Ed.), Diyabet hemşireliği Temel bilgiler, Yüce Yayın, İstanbul.
42. Satman İ, Yılmaz C, İmamoğlu Ş: Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem klavuzu. İstanbul, 2009, s. 15.
43. Altuntaş Y. Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflandırması. Yenigün M, Altuntaş Y, editörler. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001; 51-62.
44. Yılmaz T. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri ve Sınıflandırması. Ed. Yenigün M, Altuntaş Y, Büyükmeşe M. Diabetes Melitus'un Modern Tedavisi. İstanbul: Türkiye Diyabet Vakfı Yayını, 2003; s. 1-9.
45. Yenigün M, Altuntaş Y. Her yönüyle diyabetes mellitus. Nobel tıp kitapevleri. 2001, 1024.
46. Ahmed AM. "History of diabetes mellitus", Saudi medical journal, 2002, 23(4):373-8.
47. TEMD Diabetes Mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu. 6. baskı Ankara, Mayıs 2013, s. 15-38.
48. Erdoğan G. Koloğlu-Endokrinoloji Temel ve Klinik. MN Medikal&Nobel Yayınları, Ankara, 2005.

49. American diabetes association. Standards of medical Care in diabetes. Diabetes care, 2008; 31(1): 12-54.
50. TURKDİAB Diyabet tanı ve tedavi rehberi 2015, s. 13-32.
51. Zhang Y, Ren C, Lu G, Mu Z, Cui W, Gao H, et al. Anti-diabetic effect of mulberry leaf polysaccharide by inhibiting pancreatic islet cell apoptosis and ameliorating insulin secretory capacity in diabetic rats, International immunopharmacology, 2014, 22(1):248-57.
52. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. “Türkiye Diyabet Programı 2015-2020”, Ankara, 816, 2014.
53. Özyazar M. Tip I diyabetin etyopatogenezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa tıp fakültesi, Diabetes Mellitus sempozyumu, 18-19 Aralık 1997, s. 25-28.
54. Mitchell P. Fink, MD, FCCM. Ethyl pyruvate; A novel anti-inflammatory agent. Crit Care Med. 2003; 31: 51-6.
55. Varma SD, Devamanoharan PS, Ali AH. Prevention of intracellular oxidative stress to lens by pyruvate and its ester. Free Rad Res 1998; 28: 131-135.
56. Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis. Curr Drug Targets. 2007 Apr;8(4):515–8.
57. Liu YQ, Jetton TL, Leahy JL. β -cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and Malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. J Biol Chem 2002; 277:39163–8.
58. Kim J, Lee YM, Kim CS, Sohn E et al. Ethyl pyruvate prevents methylglyoxal-induced retinal vascular injury in rats. J Diabetes Res.2013; 460820 DOI:10.1155/2013/460820
59. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Cháfer-Rudilla M, Íñiguez De Onzoño L, Blázquez-Cabrera JA, Miralles-García JM. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. J Androl. 2010;31(6):584–592. doi:10.2164/jandrol.108.007260.
60. Özkorkmaz, E.G. Streptozotosin diyabetik ve benfluoreks-C vitamini tedaili sıçanların mesane dokusunda histolojik incelemeler. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi. Şubat 2008; 36. Sayfa.
61. Morsy M, Ramzy M, El-Sheikh AK, Kamel M, Abdelwahab S. Mechanism of testicular protection of carvedilol in streptozotocin-induced diabetic rats. Indian J Pharmacol. 2014;46(2):161. doi:10.4103/0253-7613.129307.

62. Büyükleblebici O, Karagül H. The biochemical effects of dietary chromium in experimental diabetic rats with streptozotocin. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012;18(1):21-26 doi:10.9775/kvfd.2011.4501.
63. 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. doi:10.1159/000178170.
64. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, vd. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: Nerve growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/108106.
65. Bal R, Türk G, Tuzcu M, vd. Protective effects of nanostructures of hydrated C60 fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology.* 2011;282(3):69–81. doi:10.1016/j.tox.2010.12.003.
66. Roy S, Rahaman N, Ahmed F, Metya S, Sannigrahi S. Naringenin attenuates testicular damage, germ cell death and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: Naringenin prevents diabetic rat testicular damage. *J Appl Biomed.* 2013;11(3):195–208. doi:10.2478/v10136-012-0026-7.
67. Amaral S, Mota PC, Lacerda B, vd. Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. *Mitochondrion.* 2009;9(1):41–50. doi:10.1016/j.mito.2008.11.005.
68. Roslan J, Giribabu N, Karim K, Salleh N. Quercetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in the heart of streptozotocin-nicotinamide-induced adult male diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 2017;86:570–582. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.044.
69. Gupta S, Kataria M, Gupta PK, Murganandan S, Yashroy RC. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. *J Ethnopharmacol.* 2004;90(2–3):185–189. doi:10.1016/j.jep.2003.09.024.
70. Ding C, Wang Q, Hao Y, vd. Vitamin D supplement improved testicular function in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473(1):161–167. doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.072.
71. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18(10):872–879. doi:10.1016/S0899-9007(02)00916-4.
72. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology.* 1997;49(4):508–513. doi:10.1016/S0090-4295(96)00573-0.

73. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl*. 2003;5(3):231–242.
74. Bahey NG, Soliman GM, El-Deeb TA, El-Drieny EA. Influence of insulin and testosterone on diabetic rat ventral prostate: Histological, morphometric and immunohistochemical study. *J Microsc Ultrastruct*. 2014;2(3):151–160. doi:10.1016/j.jmau.2014.06.002.
75. Tawadrous ZS, Delude RL, Fink MP. Resuscitation from hemorrhagic shock with ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock*. 2002;17(6):473–477. doi:10.1097/00024382-200206000-00006.
76. Park S-Y, Yi E-Y, Jung M, Lee YM, Kim Y-J. Ethyl pyruvate, an anti-inflammatory agent, inhibits tumor angiogenesis through inhibition of the NF- κ B signaling pathway. *Cancer Lett*. 2011;303(2):150–154. doi:10.1016/j.canlet.2010.12.024.
77. Kung CW, Lee YM, Yen MH. In vivo anticoagulant effect of ethyl pyruvate in endotoxemic rats. *Thromb Res*. 2011;127(6):582–588. doi:10.1016/j.thromres.2011.01.017.
78. Yang R, Zou X, Koskinen ML, Tenhunen J. Ethyl pyruvate reduces liver injury at early phase but impairs regeneration at late phase in acetaminophen overdose. *Crit Care*. 2012;16(1). doi:10.1186/cc11149.
79. Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide-induced renal injury a protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1886–1893. doi:10.1172/JCI115511.
80. Payabvash S, Kiumehr S, Tavangar SM, Dehpour AR. Ethyl pyruvate reduces germ cell-specific apoptosis and oxidative stress in rat model of testicular torsion/detorsion. *J Pediatr Surg*. 2008;43(4):705–712. doi:10.1016/j.jpedsurg.2007.12.063.

8.EKLER

8.1. EK-1 TÜBİTAK PROJE DESTEK BELGESİ



T.C.
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : B.14.2.TBT.0.06.03.02-161-61713
Konu : 216S259 Numaralı Proje Öneriniz

10/03/2017

Sayın Doç. Dr. Başak BAYKARA

"Hızlı Destek Programı" kapsamında Kurumumuza önerdiğiniz ve bilimsel değerlendirmeye alınması uygun bulunan 216S259 numaralı ve "Deneysel Olarak Oluşturulan Diyabet Modelinde Etil Pirüvat'ın Siçan Testisine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı projenize ilişkin değerlendirme süreci tamamlanmıştır.

Desteklenmesine karar verilen proje önerinizin ilgili mevzuat çerçevesinde, mali ve benzeri konularda değerlendirme çalışmalarına başlanmıştır. Süreç tamamlandığında projelere ait sözleşme ve diğer belgeler imzalanmak üzere tarafınıza gönderilecektir.

Çalışmalarınızda başarılar diler, saygılar sunarım.

Prof. Dr. Sevim AYDIN
Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu
Yürütme Komitesi Sekreteri V.

PANEL PUAN SEVİYESİ: A

A: Çok İyi B: İyi C: Orta D: İyi Değil E: Yetersiz

Panel toplam puanı A ve B seviyesinde olan projeler desteklenmiştir.

8.2. EK-2 ETİK KURUL RAPORU



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 05/07/2016
Toplantı Tarihi : 29 Mart 2016

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

19/2016 Protokol No'lu; Anabilim Dalınız Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Başak BAYKARA'nın yürütücüsü olduğu "Deneyisel Olarak Oluşturulan Diyabet Modelinde Etil Pirüvat'ın Sıçan Testisine Etkisinin İncelenmesi" isimli; Müge KIRAY, Yavuz GENÇ'in araştırmacı olduğu, 28 Adet hayvanın kullanılacağı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Gülğün OKTAY
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Mehmet Ensari GÜNELİ
Üye

Doç.Dr.Mehmet KARAMAN
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Zehra KINAM
Üye

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

Prof.Dr.Güday KIRKIM
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye
(topl.katılmadı)

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye (Topl.Katılmadı)

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.



8.3.EK-3 ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Yavuz GENÇ

TC Kimlik No / Pasaport No:	47215825172
Doğum Yılı:	1989
Yazışma Adresi :	614/3 sok. no:11 daire: 3 Yağhaneler/ İZMİR
Telefon :	554 539 00 35
Faks :	
e-posta :	gncyvz61@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TC	Süleyman Demirel Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	
--	--

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Düzenleme Tarihi: 01/01/2018

