



**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***LYCIUM BARBARUM* (KURT ÜZÜMÜ) 'UN DENEYSEL DİYABET
OLUŞTURULMUŞ ERKEK SIÇANLARDA ÜREME SİSTEMİ VE
CRISP-1 PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Gizem İLTER AKTAŞ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AĞUSTOS 2017
BOLU**



**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***LYCIUM BARBARUM* (KURT ÜZÜMÜ) 'UN DENEYSEL DİYABET
OLUŞTURULMUŞ ERKEK SIÇANLARDA ÜREME SİSTEMİ VE
CRISP-1 PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Gizem İLTER AKTAŞ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT**

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 2016.08.03.1098)

**AĞUSTOS 2017
BOLU**

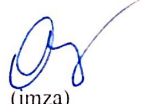
ONAY SAYFASI

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi



(imza)

Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT

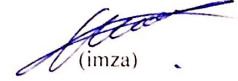
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi



(imza)

Prof. Dr. Meryem ÇAM

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Düzce Üniversitesi



(imza)

Tarih:24/08/2017

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, Gizem İLTER AKTAŞ'ın
Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

(imza)

ÖZET

***LYCIUM BARBARUM* (KURT ÜZÜMÜ)'UN DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ ERKEK SIÇANLARDA ÜREME SİSTEMİ VE CRISP-1 PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Diabetes Mellitus (DM), hiperglisemi ile karakterize, metabolik bir hastalıktır. *Lycium barbarum* polisakkaritleri (LBP) hipoglisemik, anti-apoptotik ve fertilite kabiliyetini artırıcı özellikleriyle dikkat çeken doğal bir antioksidandır. Diyabete bağlı oksidatif stres, erkek üreme sisteminde çeşitli fonksiyon bozukluklarına ve infertiliteye neden olmaktadır. Oksidatif stres; sistein amino asit grubunu içeren proteinlere daha kolay hasar vermektedir. Crisp-1 (Cysteine-rich secretory protein-1), sisteinden zengin olup epididimis epitelinden salgılanarak fertilizasyonda önemli roller üstlenen yeni bir proteindir. Çalışmamızda diyabetin erkek üreme sistemine verdiği hasarda LBP'nin olası koruyucu ve tedavi edici etkisi ile Crisp-1 protein ekspresyonundaki değişiklikleri araştırmak amaçlandı.

Çalışmamız için 3-4 aylık Wistar Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler; Sham kontrol, LBP kontrol, Diyabet ve Tedavi (diyabet + LBP) grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla STZ tek doz 55mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. LBP 15 gün boyunca günde 200 mg/kg gavaj yoluyla verildi.

Histolojik incelemelerde, diyabet grubu testis dokularında intertübüler bağ dokusunda artış, konjesyon, vakuolizasyon ve ödem gözlenirken tedavi grubunda bu oluşumların azaldığı görüldü. Tedavi grubunda; hareketli sperm sayısı, Crisp-1 pozitif hücre sayısı ve serum Testosteron düzeyinde anlamlı artış ($p \leq 0.05$), apoptotik hücre sayısı ve serum MDA düzeyinde ise anlamlı düşüş ($p \leq 0.05$) tespit edildi.

Sonuç olarak LBP'nin diyabete bağlı erkek üreme sistemi hasarında koruyucu ve iyileştirici bir etki gösterdiği ve Crisp-1 protein ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Crisp-1, Diyabet, İnfertilite, *Lycium barbarum*

ABSTRACT

THE EFFECT OF *LYCIUM BARBARUM* ON REPRODUCTIVE SYSTEM AND THE EXPRESSION OF CRISP-1 PROTEIN IN EXPERIMENTALLY DIABETIC MALE RATS

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia. *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) are natural antioxidant having hypoglycemic, anti-apoptotic and fertility enhancing properties. Diabetes-related oxidative stress leads to many reproductive dysfunctions of males and infertility. Oxidative stress can easily harm proteins which have cysteine group amino acids. Crisp-1 (Cysteine rich secretory protein-1) protein is a novel protein, expressed by the epithelium of epididymis, has important roles in fertilization. In our study it is aimed to investigate the possible protective and therapeutic effects of LBP on diabetes-related male reproductive dysfunctions and to examine the changes on expression rate of Crisp-1 protein.

In this study, 3-4 months old Wistar Albino male rats were used and randomly placed into 4 groups; Sham control, LBP control (only LBP), Diabetic and Treatment (diabetic + LBP) group. To generate experimentally diabetic rats, single dose of 55 mg/kg STZ was injected intraperitoneally. In the treatment group, the diabetic rats were administered with 200 mg/kg of LBP by gastric gavage, once a day for 15 consecutive days.

In histological examinations, increased intertubular connective tissue, congestion, vacuolization and edema were seen in testis tissues of the diabetic group. On the other hand, the treatment group's testis tissues were almost similar to sham control group. In the treatment group, the number of motile sperms, Crisp-1 positive cells and serum testosterone level were significantly increased ($p \leq 0.05$), apoptotic cell number and serum MDA level were significantly decreased ($p \leq 0.05$).

As a result, it is concluded that *Lycium barbarum* polysaccharides have a protective and therapeutic effect of on the male reproductive damages of diabetes and also enhances Crisp-1 protein expression.

Anahtar kelimeler: Crisp-1, Diabetes, Infertility, *Lycium barbarum*

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji bölümünde almış olduğum eğitimim boyunca fikirleri, tecrübesi ve insanlığıyla bana örnek olup, üstümde çok emeği geçen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Aysel KÜKNER hocama ve tez sürecimde danışmanlığımı sürdüren, bilgisi ve güler yüzüyle bana her konuda yardımcı ve destek olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT'a çok teşekkür ederim.

Hem akademik hem de insani yönüyle kısa sürede bana çok şey katan ablam Dr. Sevilay ERİMŞAH'a, senelerdir sayısız yardımını ve desteğini gördüğüm canım arkadaşım Esra FİDAN'a, yüksek lisans eğitim sürecimi daha eğlenceli hale getiren ve beraber başladığımız bu süreçte karşımıza çıkan zorlukları birlikte aştığımız bölüm arkadaşlarım, Havva İmran ÖZDEMİR ile Gizem SÖYLER'e güzel dostlukları için çok teşekkür ederim.

Bu projeyi finansal olarak destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve güler yüzleriyle her aşamada yardımcı olmaya çalışan bütün personeline teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayarak her zaman arkamda olan güzel annem Serpil İLTER ve canım babam Mehmet Uğur İLTER'e, yüksek lisans eğitim sürecimde hayatımı birleştirdiğim ve bu süreçte gösterdiği sabır ve sevgisiyle desteğini hep hissettiren biricik eşim Haluk AKTAŞ'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Gizem İLTER AKTAŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	x
GRAFİKLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Anatomisi	3
2.2. Testis Embriyolojisi	4
2.3. Testis Histolojisi	5
2.3.1. Sertoli hücreleri	7
2.3.2. Leydig hücreleri	8
2.3.3. Spermatogenez	8
2.3.4. Spermin yapısı	12
2.4. Epididimis Histolojisi	13
2.5. Crisp-1 (Cysteine Rich Secretory Protein-1)	13
2.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	15
2.6.1. Lipid peroksidasyonu	18
2.6.2. Oksidatif stresin proteinler üzerine etkileri	18
2.6.3. Oksidatif stres ve antioksidan ilişkisi	18
2.7. Diabetes Mellitus	19
2.7.1. Tanımı ve sınıflandırılması	19
2.7.2. Diyabete bağlı oksidatif stres ve erkek infertilitesi	20
2.7.3. Apoptozis	22
2.8. <i>Lycium Barbarum</i> Polisakkaritleri	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
3.1. Deney Hayvanları	27
3.2. Deney Grupları	27
3.3. Diyabet Oluşturma Modeli	28
3.4. <i>Lycium Barbarum</i> Polisakkaritlerinin Hazırlanması	28
3.5. Gavaj Uygulaması	29
3.6. Işık Mikroskopik İncelemeler	29
3.6.1. Hematoksilen-eozin boyaması	29
3.6.2. Masson'un üçlü boyaması	30
3.7. İmmunohistokimyasal İncelemeler	31
3.7.1. TUNEL işaretleme	31
3.7.2. Crisp-1 immün işaretleme	32
3.7.3. Caspase-3 immün işaretleme	33
3.8. Semen Analizi (Spermiyogram)	35
3.8.1. Anilin mavisi boyaması	35
3.9. Biyokimyasal İncelemeler	36
3.10. İstatistiksel Analiz	36

4. BULGULAR	37
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	38
4.1.1. Histolojik bulgular	38
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	52
4.2.1. TUNEL immün işaretleme	52
4.2.2. Caspase-3 immün işaretleme	57
4.2.3. Crisp-1 immün işaretleme	62
4.3. Biyokimyasal Bulgular	69
4.3.1. MDA (Malondialdehit)	69
4.3.2. Testosteron	70
4.3.3. FSH (Folikül uyarıcı hormon)	71
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ	90
9. EKLER	91
EK-1: Etik Kurul Onayı	91
EK-2: Orjinallik Raporu	92

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Testisin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.2. Testisin sagittal kesitinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.3. Seminifer epitelin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4. Spermatogenezin hormonal kontrolü	9
Şekil 2.5. Spermatogenez basamakları	11
Şekil 2.6. Spermin genel yapısı	12
Şekil 2.7. Epididim bölümleri.....	13
Şekil 2.8. Crisp1'in genel fonksiyonları	14
Şekil 2.9. Oksijen Türevleri.....	16
Şekil 2.10. Serbest radikal üretiminin şematik gösterimi	17
Şekil 2.11. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları	17
Şekil 2.12. Lipid peroksidasyonunun sonucu Malondialdehit oluşumu.....	18
Şekil 2.13. Diyabete bağlı gelişen oksidatif stresin beta hücrelerine etkisi.....	20
Şekil 2.14. Hiperglisemideki oksidatif stresin temel mekanizmaları	21
Şekil 2.15. Apoptozisin mekanizmaları.....	23
Şekil 2.16. Apoptoziste kaspaz aktivasyon mekanizması	24
Şekil 3.1. <i>Lycium barbarum</i> polisakkariterinin hazırlanışı	28
Şekil 3.2. Spermiyogram aşamaları	35
Şekil 4.1. Sham kontrol grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	39
Şekil 4.2. LBP kontrol grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	39
Şekil 4.3. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	40
Şekil 4.4. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	40
Şekil 4.5. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	41
Şekil 4.6. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	41
Şekil 4.7. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	42
Şekil 4.8. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	42
Şekil 4.9. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	43
Şekil 4.10. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	43
Şekil 4.11. Diyabet grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	44
Şekil 4.12. Tedavi grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	44
Şekil 4.13. Tedavi grubu testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	45
Şekil 4.14. Sham kontrol grubu testis, Masson Üçlü Boyaması.....	45
Şekil 4.15. Diyabet grubu testis, Masson Üçlü Boyaması.....	46
Şekil 4.16. Diyabet grubu testis, Masson Üçlü Boyaması.....	46
Şekil 4.17. Diyabet grubu testis, Masson Üçlü Boyaması.....	47
Şekil 4.18. Diyabet grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması.....	47
Şekil 4.19. Tedavi grubu testis, Masson Üçlü Boyaması	48
Şekil 4.20. Sham kontrol grubu epididimis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	48
Şekil 4.21. Diyabet grubu epididimis, Hematoksilen-Eozin Boyaması	49
Şekil 4.22. Tedavi grubu epididimis, Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	49
Şekil 4.23. Sham kontrol grubu, sperm, Anilin Mavisi Boyaması	51
Şekil 4.24. Diyabet grubu, sperm, Anilin Mavisi Boyaması	51
Şekil 4.25. Sham kontrol grubu testis, TUNEL immün işaretleme	53
Şekil 4.26. LBP kontrol grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme	54
Şekil 4.27. Diyabet grubu testis, TUNEL immün işaretleme	54

Şekil 4.28. Diyabet grubu testis, TUNEL immün işaretleme	55
Şekil 4.29. Diyabet grubu testis, TUNEL immün işaretleme	55
Şekil 4.30. Diyabet grubu testis, TUNEL immün işaretleme	56
Şekil 4.31. Tedavi grubu testis, TUNEL immün işaretleme.....	56
Şekil 4.32. Sham kontrol grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme.....	58
Şekil 4.33. Sham kontrol grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme.....	58
Şekil 4.34. LBP kontrol grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme	59
Şekil 4.35. Diyabet grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme.....	59
Şekil 4.36. Diyabet grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme.....	60
Şekil 4.37. Diyabet grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme.....	60
Şekil 4.38. Tedavi grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme	61
Şekil 4.39. Tedavi grubu testis, Caspase-3 immün işaretleme	61
Şekil 4.40. Sham kontrol grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	63
Şekil 4.41. Sham kontrol grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	64
Şekil 4.42. Sham kontrol grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	64
Şekil 4.43. Diyabet grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	65
Şekil 4.44. Tedavi grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	65
Şekil 4.45. Tedavi grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	66
Şekil. 4.46. Sham kontrol grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	66
Şekil 4.47. Sham kontrol grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	67
Şekil 4.48. Sham kontrol grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	67
Şekil 4.49. Diyabet grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	68
Şekil 4.50. Tedavi grubu epididimis, Crisp-1 immün işaretleme	68

TABLÖLAR

Tablo 4.1. Grupların ilk ağırlık ve son ağırlık değerleri	37
Tablo 4.2. Grupların kan glukoz değerleri	38
Tablo 4.3. Grupların toplam sperm sayıları	50
Tablo 4.4. Grupların hareketli sperm sayıları	50
Tablo 4.5. Grupların TUNEL pozitif hücre sayıları.....	52
Tablo 4.6. Grupların Caspase-3 pozitif hücre sayıları	57
Tablo 4.7. Grupların Crisp-1 pozitif hücre sayıları.....	62
Tablo 4.8. Serumda tespit edilen MDA değerleri	69
Tablo 4.9. Serumda tespit edilen Testosteron değerleri	70
Tablo 4.10. Serumda tespit edilen FSH değerleri	71

GRAFİKLER

Grafik 4.1. Grupların ilk ve son ağırlıklarına ait grafik.....	37
Grafik 4.2. Grupların TUNEL pozitif hücre sayısı grafiği	53
Grafik 4.3. Grupların Caspase-3 pozitif hücre sayısı grafiği.....	57
Grafik 4.4. Grupların Crisp-1 ekspresyonu grafiği.....	63
Grafik 4.5. Tüm gruplar için ölçülen MDA değerleri.....	69
Grafik 4.6. Tüm gruplar için ölçülen Testosteron değerleri	70
Grafik 4.7. Tüm gruplar için ölçülen FSH değerleri.....	71



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein
AEG-1: Asidik Epididimal Glikoprotein-1
AIP: Apoptozis İnhibitör proteinleri
AİBÜ: Abant İzzet Baysal Üniversitesi
BCL-2: B Cell Lymphoma-2
CAT: Catalase
CRISP-1: Cysteine Rich Secretory Protein -1
DEHAM: Deney Hayvanları Merkezi
DM: Diabetes Mellitus
DNA: Deoksiribonükleik asit
ELİSA: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
FSH: Follikül Uyarıcı Hormon
GDM: Gestasyonel Diabetes Mellitus
GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor
GPx: Glutasyon peroksidaz
GNRH: Gonadotropin-releasing hormone
GR: Glutasyon redüktaz
HCG: Human Chorionic Gonadotropin
IP: İntraperitoneal
LBP: *Lycium Barbarum* Polisakkaritleri
LH: Lüteinize Hormon
MDA: Malondialdehit
MIF: Müller İnhibe Faktör
MIS: Müller İnhibiton Substance
PBS: Phosphate Buffered Saline
PS: Phosphatidylserine
ROS: Reactive Oxygen Species
RNS: Reactive Nitrogen Species
SCF: Stem Cell Factor
SOD: Süperoksit dismutaz
SRY: Sex-determining Region Y
STZ: Streptozotosin
T: Testosteron
TBA: Thiobarbituric Acid
TDF: Testis Determining Factor
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
ZP: Zona Pellusida

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), insülin üretimi veya etkisiyle ilgili bozukluklar sonucu gelişen karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki dengesizlikler ve kronik hiperglisemi ile nitelendirilen metabolik bir hastalıktır (1). Diabetes mellitus, tip 1 (insulin bağımlı) ve tip 2 (insulin bağımsız) olmak üzere 2 alt grupta sınıflandırılmaktadır. DM'nin sebep olduğu hiperglisemi, oksidatif stresi tetikleyerek serbest radikal üretimi ve antioksidan savunması arasındaki dengenin bozulmasına ve doku hasarına sebep olmaktadır (2, 3). Diyabetin en önemli patolojisi, hücrelerin insulin eksikliği sonucunda glukozdan yararlanamamasıdır (4). Alınan besinler ile dolaşıma katılan glukoz, hücrelerin enerji gereksiniminde kullanılmaktadır. Ancak diyabetik hastalarda insulin salgılanması genellikle çok az miktarda olup bazen de hiç salgılanmamaktadır (5). DM, pek çok organın hasarına ve fonksiyon bozukluğuna sebep olabilmektedir (6). Bu önemli komplikasyonlardan biri de erkek üreme sistemindeki bozukluktur (7-9). Erkek üreme sisteminin en önemli yapılarından biri olan sperm hücreleri, testiste kısmen hareketsizdirler fakat epididimal olgunluktan sonra hareket kazanıp bunu muhafaza etmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar ve temel enerji kaynağı olarak glukozdan yararlanmaktadırlar (8-10). Glukoz, kan-testis bariyerinden pasif diffüzyon ile geçiş yapar ve temel hücre aktiviteleri, hareketlilik ve fertilizasyon kabiliyeti gibi fonksiyonlar için önemlidir (11). Ayrıca sperm-yumurta bağlanması boyunca da glukozu ihtiyaç duyulmaktadır (12-14). Bu nedenle anormal glukoz dengesi, erkek gametlerinde üreme fonksiyonu için olumsuz sonuçlara sahiptir (7). Hayvan ve insan ile yapılan çalışmalarda diyabetin; semen, DNA fragmentasyonu ve kromatin kalitesi gibi parametrelerde zararlı etkileri gösterilmiştir (7-9). Ayrıca testiküler fonksiyon ve spermatogenez, hem tip 1 hem de tip 2 diyabetli erkeklerde olumsuz yönde etkilenmektedir (7, 14).

Spermin zona pellusidaya bağlanıp penetre olması ve yumurta plazma membranıyla birleşmesi gibi olaylar hücre bağlantıları sayesinde gerçekleşir ve her iki gamette de bulunan spesifik moleküller tarafından düzenlenir. Bu moleküllerden biri de Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) ailesinin tanımlanmış ilk üyesi olan rat epididimal Crisp-1 proteindir (15). Crisp-1, epididimal epitelden eksprese olup lümenine salınır ve burada olgunlaşmakta olan spermin yüzeyiyle ilişkilidir (16-18).

Yapılan çalışmalara göre, Crisp proteinleri sperme, hem erkek hem de dişi üreme sisteminden geçişi boyunca eşlik eder ve fertilizasyon sürecinde pek çok önemli fonksiyona sahiptirler (19). Crisp-1 proteini sperm kapasitasyonunda, sperm-zona pellusida bağlanmasında ve sperm-yumurta füzyonunda rol almaktadır (20-23). In vitro fertilizasyon çalışmalarının sonucunda Crisp-1'den yoksun spermin zona pellusida (ZP) ile iletişimi ve yumurtayla füzyon kabiliyetinde dezavantajlı olduğu gösterilmiştir (24).

Son yıllarda, tedavi alanında doğal bitkisel çözümler aranmakta ve bu çalışmalar dikkat çekmektedir. Goji berry ya da kurt üzümü olarak da bilinen *Lycium barbarum*, geleneksel Çin tıbbında yüzyıllardır bitkisel tedavilerde kullanılmakta olup oksidatif stresi baskılayıcı antioksidan özelliği ile ön plana çıkmaktadır. *Lycium barbarum* temel olarak suda çözünebilir polisakkaritler içermekte olup A vitamini, C vitamini, B2 vitamini, selenyum, kalsiyum, demir, protein ve zengin lif yapısıyla güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir. Günümüzde artarak devam eden alışmalar, *Lycium barbarum* polisakkaritlerinin (LBP) immun sistemi düzenleyici, antitumor, antioksidan, antiradyasyon gibi pek çok önemli özelliğini göstermiştir. Ayrıca serebral arteriosklerozis, karaciğer hastalıkları, kalp hastalıkları ve diyabet tedavisinde kullanılmıştır. Yapılan alışmalar ayrıca, *Lycium barbarum*'un kan şekerini düşürdüğünü ve erkek fertilitelerini artırıcı etkiye sahip olduğunu da göstermektedir. Bu sebeple *Lycium barbarum*, diyabet tedavisi ve erkek fertilitesinde etkili doğal bir materyal olarak göze çarpmaktadır (25-31).

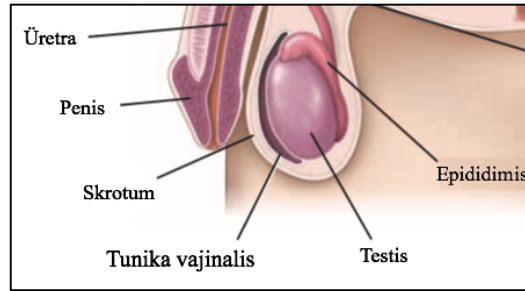
Konu ile ilgili yapılan kaynak taramalarında, diyabetin erkek fertilitesine etkilerini kapsamlı biçimde ortaya koyan çalışmaların az sayıda olduğu ve *Lycium barbarum*'un etkisinin diyabetik erkek sıçanlarda üreme sistemi üzerine araştırılmadığı grlmştir. Bu nedenle, deneysel diyabet oluşturulan Wistar Albino erkek ratlarda *Lycium barbarum*'un etkilerini; testis ve epididimisin histolojik yapıları, sperm hücreleri ve Crisp-1 protein ekspresyonu üzerinde araştırmayı amaçladık. Bu sayede elde edilecek veriler sonraki çalışmalara da kaynak oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

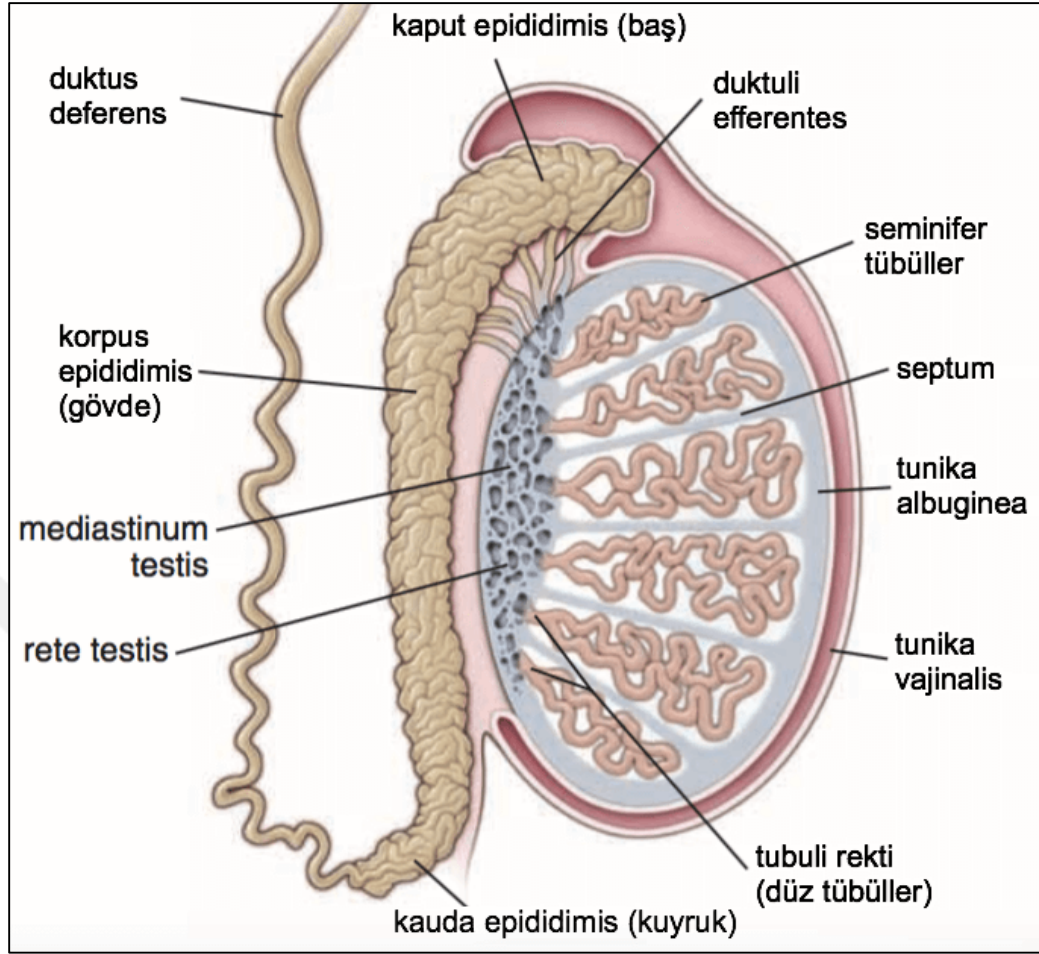
2.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi; sperm üreten ve androjenleri salgılayan **testis**lerden, spermin depolanması ve taşınmasından sorumlu kanallar sistemini oluşturan **duktus epididimis**, **vas deferens (duktus deferens)**, **ejakülatuar kanal** ve **üretranın bir kısmından**, salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozaya besinler sağlayan yardımcı bezlerden (**seminal vezikül**, **prostat bezi** ve **bulboüretral bez**) ve **penisten** oluşmaktadır.

Testisler vücut boşluğu dışındaki **skrotum** içerisinde yer alan ve bir çift halinde bulunan oval şekilli organlardır (Şekil 2.1). Bu yerleşimleri normal spermatogenez için gerekli olan, vücut ısısından 2-3°C derece daha düşük, 34-35°C derecelik bir ısıda olmalarına yardım eder. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde **spermatik kordon** ile asılıdır. Spermatik kordon; vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içerir. Testis, kalın bir bağ dokusu kapsülü olan **tunika albuginea** ile çevrelenmiştir (Şekil 2.2). Testisin posteriyor yüzü boyunca tunika albuginea kalınlaşıp içeriye **mediastinum testis** olarak uzanır. Her bir testis, kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki **septumlar** tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. Testisin her bir lobülü, içinde sperm üretilen 1-4 adet **seminifer tübül** ve interstisyel Leydig hücrelerinin bulunduğu bir bağ dokusu (stroma) içerir. Seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 150 mikrometre çapında ve 80 cm uzunlukta olup rete testise açılır. **Tubulus rektus**, seminifer tübülleri rete testise bağlar. **Rete testis**, seminifer epitelyumun ürünlerini (sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (32, 33).



Şekil 2.1. Testisin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi. (32)



Şekil 2.2. Testisin sagital kesitinin şematik gösterimi. (32)

Gebeliğin yaklaşık 26. haftasında testisler abdomenden skrotuma inerler. Testisler inerken beraberlerinde kan damarlarını, lenf damarlarını, otonomik sinirleri ve **tunika vajinalis** adlı testis yüzeyini saran abdominal periton uzantısını da sürüklerler. Her bir testis, abdominal aortanın bir dalı olan **testiküler arter** yoluyla kanlanır. Testise yakın alanda kıvrımlı olan testiküler arterin çevresinde abdominal venlere testisten aldığı kanı taşıyan **pampiniform venöz pleksus** bulunmaktadır. Kan damarlarında karşılıklı ısı değişimine olanak sağlayan bu düzenleme testislerin düşük sıcaklıkta tutulmalarına yardımcı olmaktadır (32, 33).

2.2. Testis Embriyolojisi

Primordiyal germ hücreleri ilk kez 4 haftalık fetüste vitellüs kesesi duvarının endoderminde ortaya çıkar. 4. ve 6. haftalar arasında, yaklaşık 10-100 primordiyal germ hücresi vitellüs kesesinden bağırsak tüpüne, oradan da mezenter

boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına göç ederler. Arka vücut duvarında yaklaşık 2500-5000 primordiyal germ hücresi, **genital tüberkül** oluşumunu uyarır.

Fetal gelişimin 7. haftasına kadar, her iki cinsiyet için genel bir gonad tipi mevcuttur (33). Henüz farklanmamış olan gonad yapısı; dışta korteks, içte ise medulladan oluşmaktadır. XX kromozomuna sahip embriyoda, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklanır, medullası geriler. XY kromozomlu embriyoda ise, medulla testise farklanır, korteks geriler (34). Testisin gelişimi, **Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi** (sex-determining region of Y chromosom, **SRY**) üzerindeki gen tarafından kodlanan ve **testis-belirleyici faktör** (testis-determining factor, **TDF**) olarak adlandırılan bir gen ürünü ile kontrol edilir.

Fetal testis, tubuli rekti aracılığıyla rete testise bağlanmış seminifer kordonlardan oluşur. Bu kordonlar; sölomik epitelden köken alan **Sertoli hücrelerinden** ve primordiyal germ hücrelerinden köken alan **spermatogonyumlardan** oluşur. Seminifer kordonlar, mezonefrik mezenşimden köken alan **Leydig hücreleri** tarafından birbirinden ayrılmışlardır. Fetal Sertoli hücreleri, **Müller (paramezonefrik) kanalların** gelişmesini engelleyen **Müllerian inhibe edici madde** (Mullerian Inhibiting Substance, **MIS**) salgılar. MIS yokluğunda, Müller kanalları varlığını sürdürür ve dişi genital organları haline gelir.

Gebeliğin 8. haftasında fetal Leydig hücreleri testosteron üretir ve bu üretim, fetal hipofiz LH salgılamadığı için, plasental human koryonik gonadotropin (human chorionic gonadotropin, **hCG**) tarafından düzenlenir. **Wolff (mezonefrik) kanalının** sefalik ucu epididimi, vas deferensi ve ejakülatuar kanalı oluşturur. Vas deferensin bir çıkıntısı seminal vezikülleri oluşturur.

Testisin alt kutbunda **gubernakulum** oluşur, karın duvarını oblik (eğimli) olarak karşıdan karşıya geçer ve skrotal şişkinliğe yapışır. 28. haftada testis, inguinal halkanın içine doğru aşağıya hareket eder. Gubernakulum büyür ve testis skrotum içine iner (33)

Testosteron üretimi, embriyonik ve fetal gelişimin 8-12. haftalar arasındaki dönemde en yüksek miktarlara ulaşan hCG tarafından uyarılır (34).

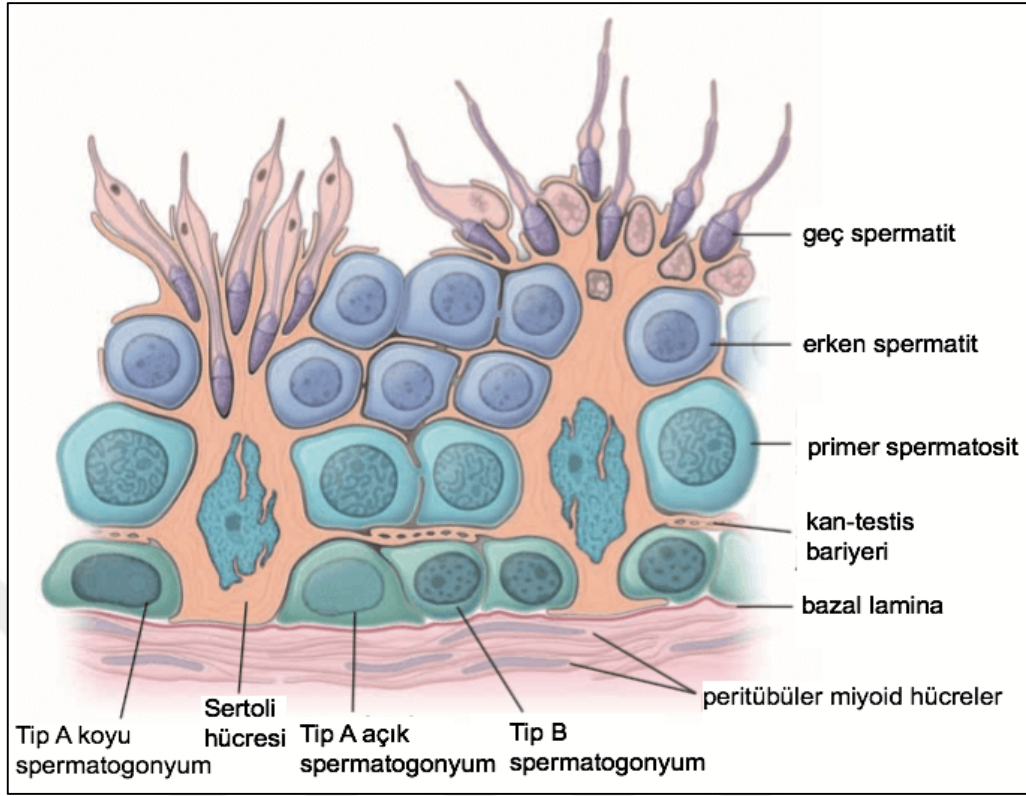
2.3. Testis Histolojisi

Testis, oldukça kalın ve sıkı bağ dokusu yapısındaki kapsül olan **tunika albuginea** ile çevrelenmektedir. Kapsülün iç kısmı olan **tunika vasküloza** ise kan

damarları içeren gevşek bir bağ dokusudur. Kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki **septumlar** testisi yaklaşık 250 lobüle bölmektedir. Lobüller, içinde sperm üretilen yaklaşık 1-4 **seminifer tübül**den ve **Leydig (interstisyel)** hücrelerinin bulunduğu bağ dokusu yapısındaki **stroma**dan meydana gelmektedir. Tunika albuginea, testisin posteriyor yüzünde daha da kalınlaşarak **mediastinum testis** adı verilen yapıyı oluşturur. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise giriş ve çıkışlarda mediastinumun içinden geçer (32).

Her testiste yaklaşık 250-1000 **seminifer tübül** bulunur ve her tübül yaklaşık 150-250 mikrometre çapında, 30-70 cm uzunluğundadır. Tübüller kıvrımlıdır ve **tubuli rekti** (düz tübüller) aracılığıyla rete testise bağlanırlar. **Rete testis**, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir yapıdır (35).

Seminifer tübüller; iki belirgin hücre popülasyonu olan, **Sertoli hücrelerini** ve **spermatogenik hücrelerini** (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatitler) içermekle birlikte merkezi bir lümene sahiptirler. İntertübüler alanda ise kan damarları ve lenfatik sinuzoidlerle birlikte **Leydig hücreleri** bulunmaktadır. Seminifer tübüller özelleşmiş bir **seminifer epitelden** meydana gelmektedirler (Şekil 2.3). Bu seminifer epitel bir **bazal membran**, **kollajen lifler**, **fibroblastlar** ve kasılabilir **miyoid hücreler** ile çevrelenmektedir. Miyoid hücreler, spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur. Spermler ancak epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri hareketlilik özelliğini kazanırlar (33).



Şekil 2.3. Seminifer epitelin şematik gösterimi. (32)

2.3.1. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da adlandırılırlar. Bu hücreler, puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipidir ancak puberteden sonra çoğalmazlar. Komşu spermatogenik hücrelerin arasındaki boşlukları doldurarak onları çevreleyen, apikal ve lateral uzantıları olan prizmatik ya da üçgenimsi hücrelerdir. Seminifer epitel boyunca uzanarak tübüllere yapısal düzen sağlamaktadırlar. Sertoli hücrelerinin çekirdeği olukludur ve belirgin bir çekirdekçiğe sahiptirler. Komşu Sertoli hücreleri ile okludens bağlantıları oluştururlar. Bu bağlantılar sayesinde, gelişmekte olan spermatositleri ve spermatitleri otoimmün reaksiyonlardan ve diğer zararlı dış etkenlerden koruyan **kan-testis bariyeri**ni meydana getirirler.

Sertoli hücrelerinin **en önemli görevleri**; spermatogenik hücrelere destek sağlamak, korumak ve beslemek; spermatitler tarafından atılan rezidual (artık) cisimcikleri fagositoz ile ortadan kaldırmak, olgun spermatitlerin tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak ve seminifer tübül lümenine proteinler ile iyonlardan zengin bir salgı yapmaktır (32, 33).

Sertoli hücreleri hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapabilmektedirler. Olgunlaşmakta olan spermlerin kanallara ilerlemesini kolaylaştıran sıvının salgılanması yanı sıra çeşitli önemli faktörler de üretmektedirler. Bunlardan biri **androjen bağlayıcı protein** (androgen binding protein, **ABP**)'dir. ABP, gelişmekte olan spermin normal olgunlaşması için gerekli olan testosteronu seminifer tübüllerde konsantre eder. Sertoli hücrelerinin yüzeyinde **FSH** ve **Testosteron** reseptörleri bulunmaktadır. Bu nedenle hem FSH hem de Testosteron tarafından salgılama fonksiyonları kontrol edilir. FSH, ABP sentezini ve sekresyonunu düzenler. Sertoli hücreleri ayrıca, **inhibin** ve **aktivin** de salgırlar. İnhibin, FSH salınımı üzerinde negatif feedback (geri etki), aktivin ise pozitif etki gösterir.

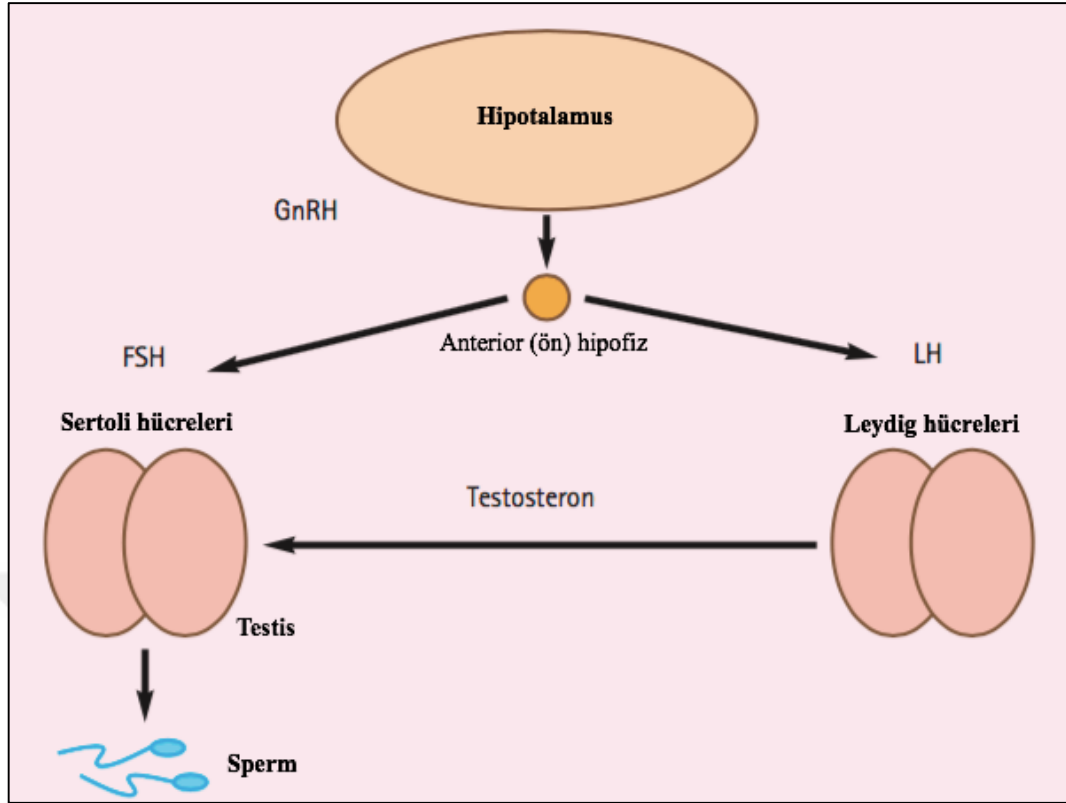
Müller inhibe edici faktör (**MIF**), kök hücre faktörü (stem cell factor, **SCF**), gliyal hücre kaynaklı nörotropik faktör (glial cell-derived neurotrophic factor, **GDNF**), **plazminojen aktivatör** (demir transport proteini) ve **seruloplazmin** (bakır taşıyıcı protein) gibi faktörler de Sertoli hücrelerinden salgılanmaktadırlar (32, 33).

2.3.2. Leydig hücreleri

İnterstisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücreleri, tübüller arası (intertübüler) alanda yer alan büyük, poligonal ve eozinofilik hücrelerdir. Leydig hücreleri, LH ile uyarılmasının ardından **testosteron** üretirler. Testosteronun salgılanması; embriyonik gelişim, cinsel olgunluk ve üreme kabiliyeti için gereklidir. Erkek fetusta, gonadların normal gelişimi için, 8. haftada testosteron üretimi başlar. Leydig hücreleri, fetal hayatın yaklaşık 5. ayından puberteye kadar ise inaktif halde beklerler. Pubertede LH uyarısıyla tekrar aktif hale geçerek yaşam boyu aktif kalırlar. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık olarak %95'i Leydig hücreleri tarafından, geri kalanı da adrenal korteks tarafından sentezlenmektedir (32, 33).

2.3.3. Spermatogenez

Spermatogenez, testiste meydana gelen ve spermatogonyumların olgun sperme dönüştüğü olaylar serisidir. Spermatogenez süreci hormonal bir kontrol altında olup, hipotalamus → pitüiter (hipofiz) → testis eksenini boyunca gerçekleşen nöroendokrin aktivite ile yönetilir (36) (Şekil 2.4). Bu süreç, puberteden kısa bir süre önce pitüiter gonadotropinlerin artmasıyla başlar ve yaşam boyu devam eder.



Şekil 2.4. Spermatogenezin hormonal kontrolü. (37)

Süreç temel olarak üç farklı faza ayrılmaktadır: spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatit fazı. **Spermatogonyal fazda** spermatogonyal kök hücreler mitoz bölünme ile kendi yerlerini alacak hücreleri ve primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum popülasyonunu meydana getirirler. Spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazalinde yer alırlar. Rutin histolojik preparatlardaki nükleus görünimleri dikkate alınarak temelde 3 tip olarak sınıflandırılmaktadırlar (32, 33).

Tip A koyu spermatogonyumlar yoğun bazofilik oval nükleuslara sahiptirler. Bu hücrelerin kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Bölünerek bir kısmı kök hücre olarak kalırken bir kısmı da Tip A açık spermatogonyumları oluşturur.

Tip A açık spermatogonyumlar, açık renkte boyanan oval nükleuslara sahiptirler. Ard arda mitotik bölünmeler ile sayılarını arttıırırlar. Farklılaşma sürecine girerek spermi oluşturacak hücrelerdir.

Tip B spermatogonyumlar, Tip A spermatogonyumların birkaç bölünmesinden sonra farklılaşması ile meydana gelirler. Yoğunlaşmış kromatinli

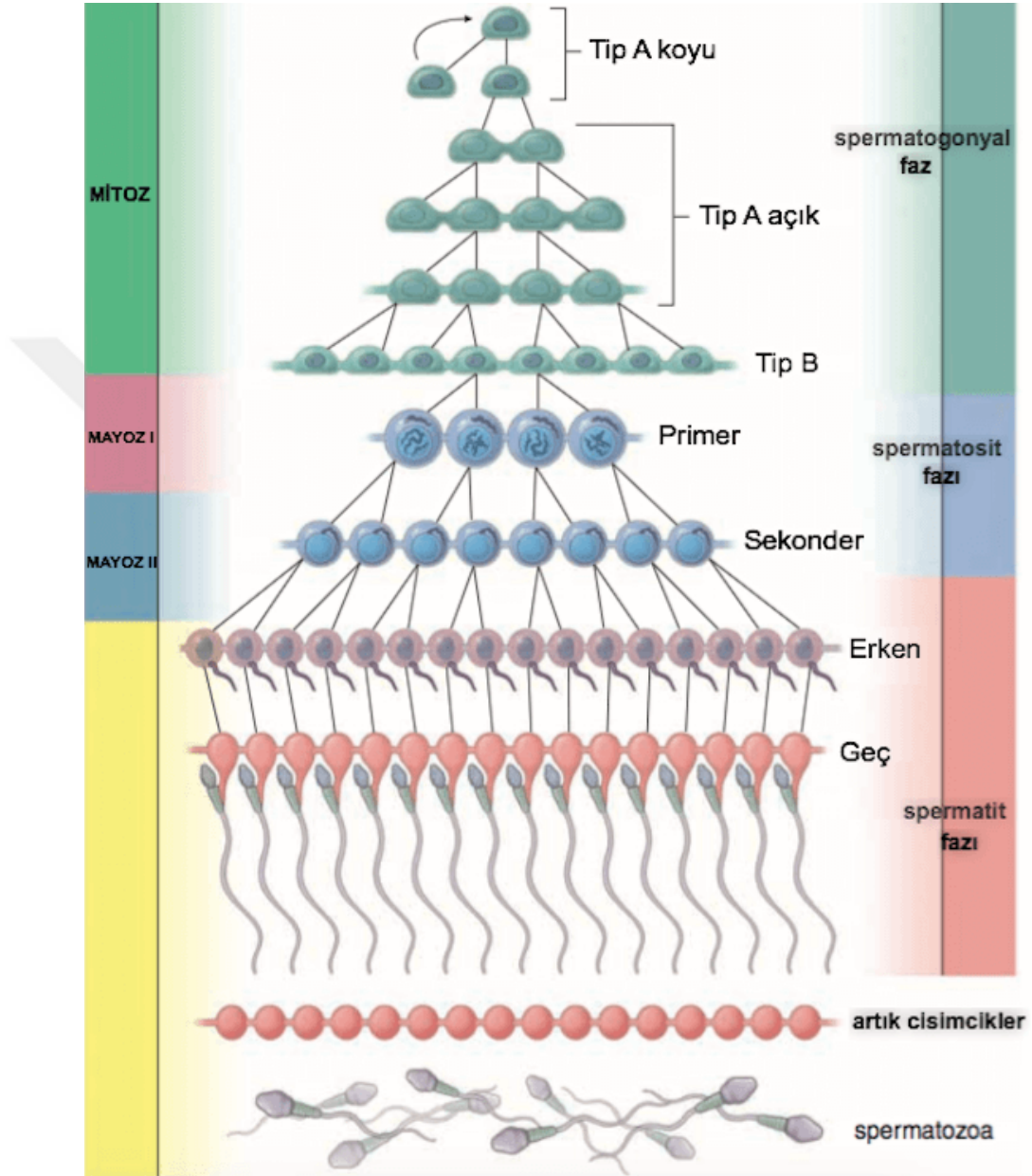
yuvarlak nukleusları vardır. Spermatogonyal fazın sonunu temsil ederler. Sonrasında Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünerek **primer spermatosit**leri üretirler.

Spermatosit fazında primer spermatositler iki adet **mayoz** bölünmeye uğrarlar. Böylece kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azaltarak spermatit adı verilen haploid hücreleri oluştururlar. Birinci mayotik bölünme sonucu oluşan hücreler **sekonder spermatosit** olarak adlandırılır. Bu hücreler yeni DNA sentezi yapmadan ikinci mayoz bölünme geçirirler. İkinci mayoz tamamlandığında bir sekonder spermatositten, her biri 23 tek iplikli kromozom(n) içeren iki haploid **spermatit** oluşur.

Spermatit fazında spermatitler olgun sperm hücrelerine (spermatozoa) farklılaşırlar. Bu farklılaşmaya **spermiyogenez** adı verilir (32). Spermiyogenezdeki üç ana olay; akrozom gelişimi, flagellum gelişimi ve nuklear yoğunlaşmadır. Akrozom gelişimi; golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma fazı olmak üzere dört ardışık evreden oluşmaktadır (33).

Golgi evresinde hidrolitik enzimler Golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılır. **Akrozomal vezikül** glikoproteinden zengin periyodik asit-Schiff pozitif boyanan granüllerin bir araya gelerek oluşturduğu yapıdır. Gelişmekte olan spermin ön kutbunu akrozomal vezikülün pozisyonu belirler. Ayrıca sentriyol çifti de akrozomal vezikülün zıt kutbuna göç etmeye başlarlar. **Kep evresinde** akrozomal vezikül yeniden şekillenerek yassılaşır. Nukleusun ön yarısı üzerinde yayılarak çevresini sarmaya başlar. Bu yapıya **akrozomal kep** denilmektedir. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün zıt kutbuna ulaşmıştır. Seminifer tübül lümeninde, spermatid akrozomal bölge bazal kompartmana bakacak şekilde yön değiştirir. **Akrozomal evrede** spermatid Sertoli hücresine iyice gömülür. Akrozom çekirdeğin üçte birlik bir kısmını örter. Manşet gelişir. Distal sentriyolden, 9'u periferde 2'si merkezde olmak üzere 9+2'lik mikrotübül çiftlerinden oluşan **aksonem** gelişir. Mitokondriyonlar gelişen aksonem boyunca göç ederler. **Olgunlaşma evresinde** keratin içerikli dış yoğun lifler (kalın lifler) gelişir ve aksonem boyunca dizilirler. Mitokondriyonlar, gelişmekte olan **flagellum (kuyruk)** boyunca dizilmelerini tamamlarlar. Flagellum keratin içerikli dış yoğun liflerle (kalın lifler) sarılı merkezi bir aksonemden meydana gelir. Çekirdek yoğunlaşır ve uzar. Manşet kaudale göç eder ve sonrasında dağılır (33). Spermatid olgunlaşmasının bu son fazında flagellum

etrafındaki sitoplazma azaltılır ve olgun **spermatozoon** meydana gelir. Atılan sitoplazma kısmı **rezidüal cisimcik** olarak da adlandırılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir (32).

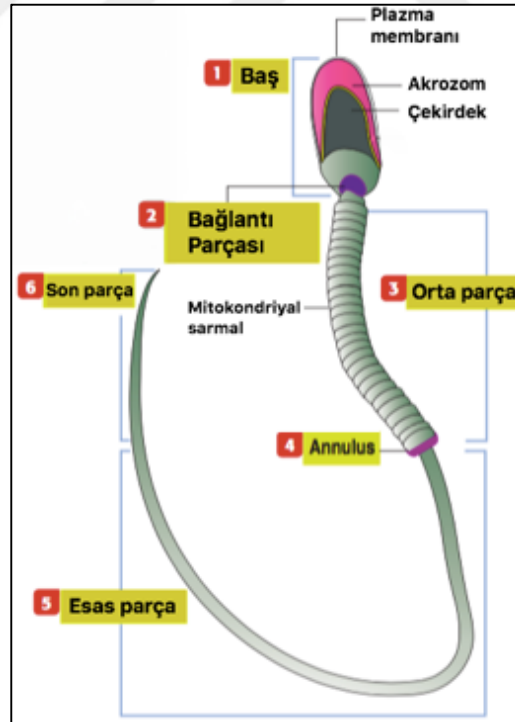


Şekil 2.5. Spermatogenez basamakları. (32)

Spermiyogenezdeki olaylar yapısal olarak eşsiz bir hücre oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Spermatogenezin sonunda spermatitler son olgunlaşma evresini geçirdikten sonra **spermiasyon** adı verilen bir süreç ile seminifer tübülün lümenine salıverilirler (32).

2.3.4. Spermin yapısı

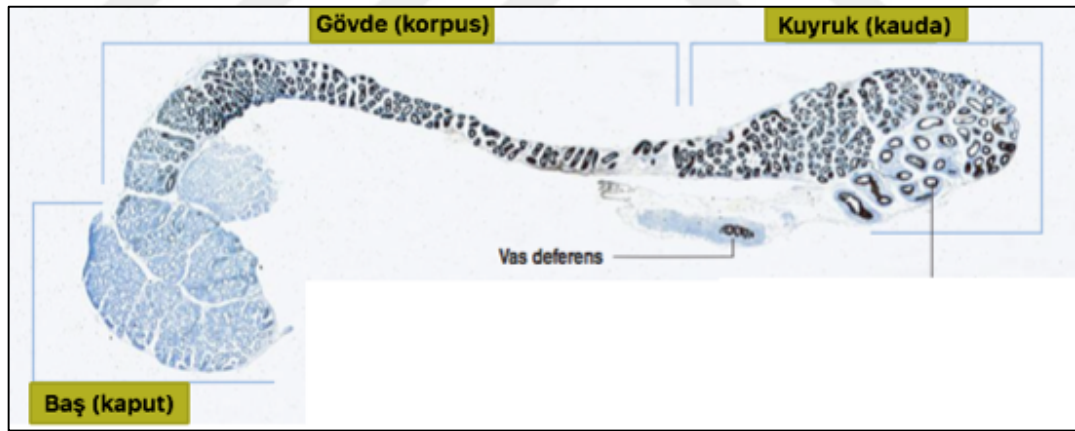
Olgun sperm; baş, kuyruk ve onları birbirine bağlayan bir bağlantı (boyun) parçasından oluşmaktadır (Şekil 2.6). Spermin baş ve kuyruk kısmını bir plazma membran sarmaktadır. **Baş** kısmı, akrozom ile sarılmış yassı ve yoğun bir çekirdekten oluşur. Ayrıca bu kısım **akrozomal hidrolitik enzimler** (proteaz, asit fosfataz, hiyaluronidaz, nöraminidaz ve akrozin) içermektedir. Bu akrozomal enzimler ile yumurta etrafındaki zona pellusidanın yıkılması olayına **akrozom reaksiyonu** adı verilmektedir. **Bağlantı parçası**, bir çift sentriyol içeren dar bir parçadır. **Kuyruk** kısmı; orta, esas ve son parça olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. **Orta** parça sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonları, kalın fiberleri ve aksonemal kompleksi içermektedir. Mitokondriyonlar kuyruğun hareketi için gereken enerjiyi sağlarlar. Orta parçanın esas parçaya dönüştüğü, mitokondriyon sarmalın son halkası **annulus** olarak adlandırılır. **Esas** parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Kalın fiberler ve aksonemal kompleks ile birlikte bunları saran bir fibröz kılıf içermektedir. **Son** parça ise sadece aksonem içeren kısa bir parçadır (32, 33).



Şekil 2.6. Spermin genel yapısı. (33)

2.4. Epididimis Histolojisi

Testislerde üretilen spermler, seminifer tübül lümeninde, Sertoli hücrelerinin salgılamış olduğu bir sıvı içerisinde. Kasılabilen miyoid hücrelerin peristaltik hareketleri sayesinde spermler buradan ayrılarak kanallar boyunca ilerlemeye başlarlar. Seminifer tübüllerden tubuli rektiye (düz tübüller) geçerler, oradan sırasıyla rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens yolunu izleyerek ejakülatuar kanala ulaşır buradan da ejakülasyon ile dışarıya atılırlar. Epididimis testisin süperiyor ve posteriyor yüzeyleri boyunca uzanan, hilal şekilli ve kıvrımlı bir tübül yapısıdır. Bu yapı duktuli eferentes, duktus epididimis, düz kas, damarlar ve bağ dokusu örtüsünden oluşmaktadır. Epididimis kanalı; **baş** (kaput), **gövde** (korpus), **kuyruk** (kauda) olarak üç ana bölüme ayrılmaktadır (Şekil 2.7). Epididimis epitel **stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatiktir**. Epitel 2 ana hücre tipi içermektedir. **Esas hücreler**, lümene uzanan, stereosilyalı uzun prizmatik hücrelerdir. **Bazal hücreler** ise bazal lamina üzerindeki daha küçük yuvarlak hücrelerdir (33).



Şekil 2.7. Epididiminin bölümleri. (33)

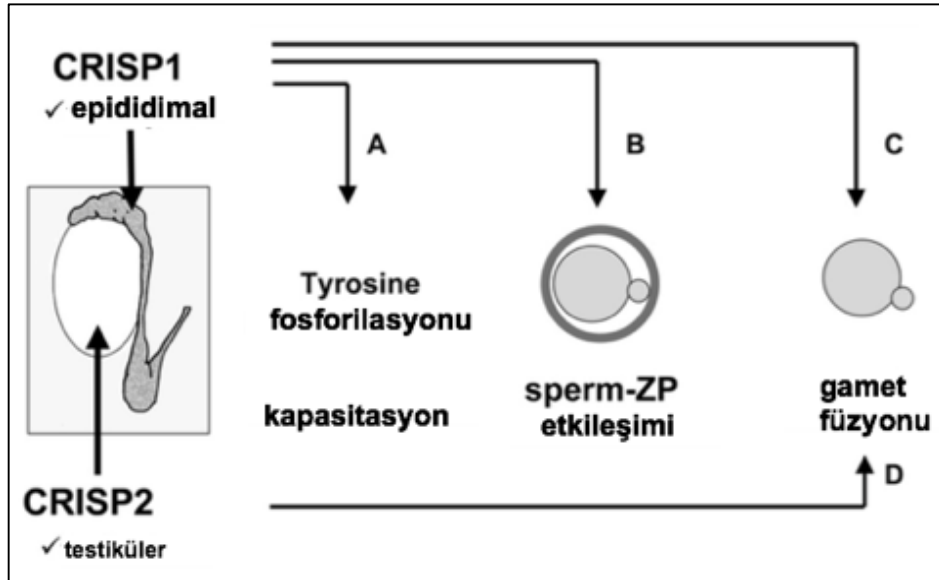
2.5. Crisp-1 (Cysteine Rich Secretory Protein-1)

Crisp-1 (Cysteine Rich Secretory Protein-1) ilk olarak 1976'da rat epididiminde tanımlanan androjen bağımlı bir glikoproteindir (15). Cysteine Rich Secretory Protein ailesinin tanımlanan ilk üyesi olan Crisp-1 proteini, diğer iki epididimal protein olan Asidik Epididimal Glikoprotein-1 (AEG-1) ve ARP/HCRISP-1 ile %100 homoloji sergilemektedir (38).

Cysteine Rich Secretory Protein ailesinin bilinen 4 üyesi bulunmaktadır ve hepsi ekspresyon yeri, fonksiyon vb. gibi pek çok açıdan farklılığa sahiptirler. CRISP-2 yalnızca testiste, CRISP-4 hem epididim hem testiste CRISP-3 ise prostat, ovaryum, tükürük bezi, pankreas gibi çeşitli organlarda bulunurlar (19, 39-42).

CRISP-1, epididimisin bütün kısımlarında bulunsa da temel olarak kauda bölgesinden eksprese olmaktadır. Epididim epitelindeki esas hücreler tarafından eksprese edilen CRISP-1 lümene salınır ve buradan da sperm yüzeyine bağlanır (43). Spermde önce akrozomun dorsaline yerleşip, akrozom reaksiyonu sırasında ekvatoryal segmente göç eder (44, 45). Crisp-1 proteini, D ve E olmak üzere iki izoformdan meydana gelmektedir ve bu yüzden DE protein olarak da bilinir. Crisp1'in %70'lik kısmını D formu oluşturmaktadır. D formunun dekapasitasyon faktör olarak, E formunun ise özellikle fertilizasyonda görev aldığı düşünülmektedir (17, 46).

D formu daha gevşek, E formu ise daha sıkı bir şekilde bağlanır ve akrozom reaksiyonundan sonra da sperm yüzeyinde kalır. Böylece zona pellusidaya bağlanma ve gamet füzyonu gibi fertilizasyondaki önemli aşamalarda rol alır (24, 45, 47, 48) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Crisp1'in genel fonksiyonları. (24)

Crisp-1'in fertilizasyondaki görevlerini araştırmak için yapılan in vitro fertilizasyon alışmaları, Crisp-1'den yoksun spermilerin zona pellusidaya ve yumurta plazma membranına bağlanmada kontrol grubuna kıyasla dezavantajlı olduğunu göstermiştir (24). Ayrıca zona pellusidasız (zona-free) yumurtaların kullanıldığı in vitro çalışmalarında da Crisp-1'den yoksun spermın füzyon yeteneğinde anlamlı bir azalma gösterilmiştir (24, 45). Farklı deneysel çalışmalar ile Crisp-1'in rat sperm kapasitasyonu sırasında tyrosine fosforilasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiş, kapasitasyon sırasında spermden Crisp-1 proteinin salındığı da gösterilerek dekapasitasyon faktör olarak rol aldığı sonucuna da varılmıştır (17, 46, 47). Yapılan bu çalışmalarla edinilen bilgilerin ışığında Crisp-1; spermın zona pellusidaya bağlanması ve yumurtaya bağlanıp birleşebilmesi için gerekli olup dekapasitasyon faktör olarak davranması da fertilizasyon süreci için çok önemlidir.

2.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektrona sahip reaktif kimyasallardır. Serbest radikaller hücre komponentleri ve molekülleriyle tepkimeye girerek onların oksidasyonuna sebep olur ve böylece hücre hasarını indüklerler (49).

Canlı organizmada aerobik şartlarda serbest radikallerin en önemli kaynağı moleküler oksijendir. Yani aerobik ortamda serbest radikallerin çoğu oksijen radikali halindedir (50, 51).

Hücrelerde endoplazmik retikulum ve mitokondride oksijen molekülü ve süperoksit oluşur. Bu oluşumda peroksizomlarda yerleşik olan flavin oksidaz gibi enzimler rol oynar. Radikallerin çoğu mitokondrideki elektron transport zinciri ile meydana gelir. Organizmanın soluduğu oksijenin %95 i H_2O ' ya indirgenirken, kalan %5'i reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) meydana getirir (52-54).

Reaktif oksijen türleri (ROS), oksijen molekülü içeren kimyasal reaktif moleküller olup radikal olan hidroksil iyon (OH), süperoksit iyon (O_2), nitrik oksit iyon (NO) ve radikal olmayan ozon (O_3), oksijen (O_2), lipid peroksit (LOO), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi molekülleri temsil eder (55).

Reaktif Oksijen Bileşikleri	Reaktif Olmayanlar
O_2^- : Süperoksit	H_2O_2 : Hidrojen Peroksit
$^{\bullet}OH$: Hidroksil	O_2 : Singlet Oksijen
$HO^{\bullet}$: Hidroperoksil	$HOCl$: Hipokloröz Asit
$RO^{\bullet}$: Alkoksil	$ONOO^-$: Peroksinitrit Radikali
$ROO^{\bullet}$: Peroksil	O_3 : Ozon
$NO^{\bullet}$: Nitrik Oksit	$LOOH$: Lipid Hidroperoksit
NO^- : Azot Dioksit	

Şekil 2.9. Oksijen Türevleri

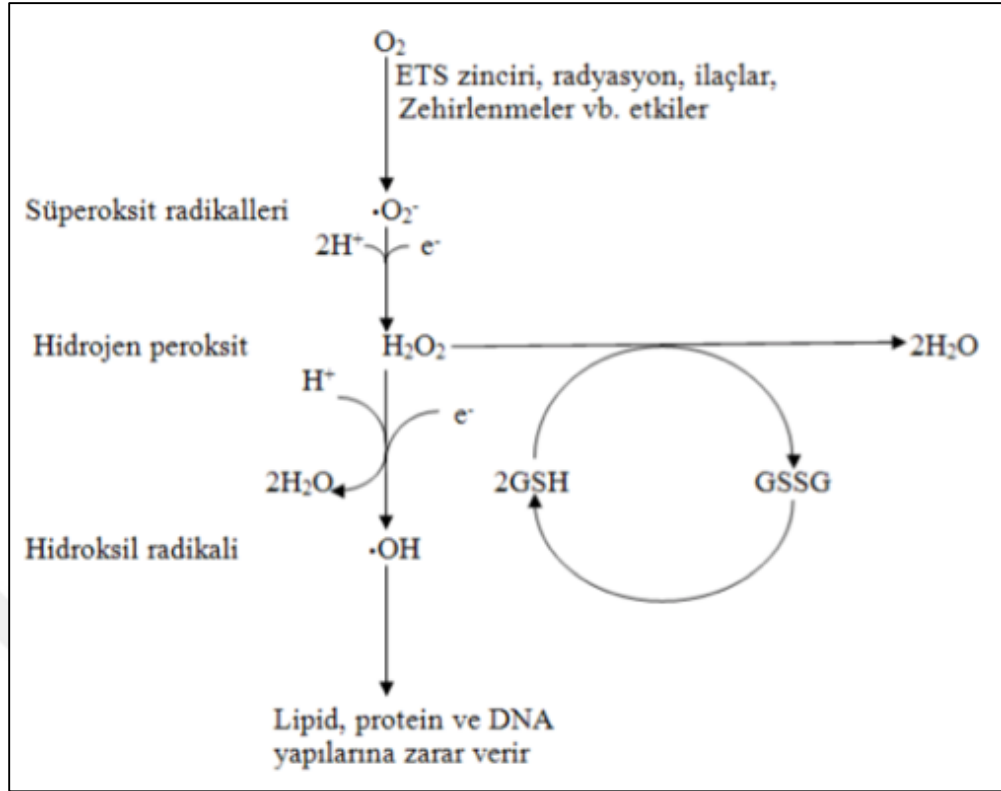
Süperoksit Radikali (O_2^-); Oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle meydana gelir. Koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla H_2O_2 'e indirgenir. Süperoksit radikali çok fazla toksik olmayan bir serbest radikaldir.

Hidrojen Peroksit Radikali (H_2O_2); Oksijen molekülünün 2 elektron ve 2 H^+ ile tepkimeye girmesiyle meydana gelir. Biyolojik sistemlerde iki süperoksit molekülü iki hidrojenle reaksiyona girerek H_2O_2 ve O_2 oluşur. Biyolojik membranları kolayca geçebilir ve uzun ömürlü bir oksijen bileşiğidir. Hidrojen peroksit, serbest oksijen radikalleri içinde sayılan ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynayan bir üründür (56).

Hidroksil Radikali ($^{\bullet}OH$); En kısa ömürlü ve en reaktif radikal olarak özellikle yakın çevresindeki dokularda büyük hasara sebep olur.

Nitrik oksit Radikali ($NO^{\bullet}$); Oldukça reaktif bir molekül olup yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilir. Endotel hücresi, sinir hücresi, düz kas hücresi, makrofaj ve trombosit gibi çeşitli hücrelerde, nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla sentezlenir. Düşük dozda bulunması yararlı iken yüksek dozu zararlıdır (57).

Serbest oksijen türleri farklı reaksiyonlarda meydana gelirler ve reaktif olurlar (58-60).



Şekil 2.10. Serbest radikal üretiminin şematik gösterimi. (61)

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2\cdot$	Hidroperoksil radikali ($HO_2\cdot$)
$HO_2\cdot \rightarrow H^+ + O_2\cdot$	Süperoksit radikali ($O_2\cdot$)
$O_2\cdot + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
$H_2O_2 + e \rightarrow OH + OH\cdot$	Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)
$OH\cdot + e + H^+ \rightarrow H_2O$	Hidrojen peroksit (H_2O_2)

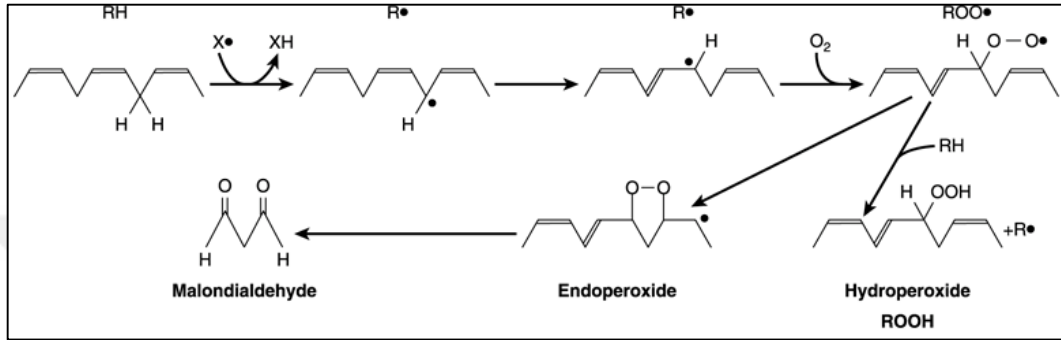
Şekil 2.11. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları

Organizmada serbest radikallerin üretim hızı ile bunları ortadan kaldıran antioksidan savunması hızı bir denge içerisinde ve buna “oksidatif denge” denilmektedir. Oksidatif stres ise bu dengenin bozulması durumudur (62).

Oksidatif stres; DNA, lipidler ve proteinler dahil bütün biyomoleküllere hasar verebilir. Bu oksidatif hasar DNA zinciri kırılmalarına, lipid peroksidasyonuna ve amino asit modifikasyonlarına yol açabilir. Amino asitlerden bazıları oksidasyona daha fazla maruz kalabilmektedir. Bunlar; terminal sülfidril grubu bulunduran (metionin, sistein) amino asitler ile aromatik amino asitlerdir (63).

2.6.1. Lipid peroksidasyonu

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en çok etkilenen yapılardan biri de membran lipidleridir. Hücre membranındaki yağlar serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucunda malondialdehit meydana gelir (63-69).



Şekil 2.12. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan Malondialdehit (MDA) oluşumu. (70)

Lipid peroksidasyonunun organizmadaki bazı etkileri şunlardır (71);

1. Membran akışkanlığı azalarak normalde hücreye giremeyen maddelerin girişi artar.
2. Lipid peroksitler ve alkoksil radikaller; triptofan ve sistein gibi aminoasitlere zarar vererek proteinin yapısını bozarlar.
3. Hücre membranına yakın bulunan DNA molekülleri hasar görür.

2.6.2. Oksidatif stresin proteinler üzerine etkileri

Serbest radikal hasarının proteinleri ne kadar etkileyeceği aminoasit içeriğine bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler oksidatif hasardan daha kolay bir şekilde etkilenmektedirler (60, 72).

2.6.3. Oksidatif stres ve antioksidan ilişkisi

Oksidatif hasarı engellemek için vücudun doğal bir antioksidan savunma mekanizması vardır. Antioksidanlar, hayati moleküller hasarlanmadan önce serbest radikallerle tepkimeye girip süreci sonlandıran moleküllerdir (73). Endojen ve

ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endojen antioksidanlar, biyolojik moleküllerin oksidasyonunu engelleyen enzimatik antioksidanları içerir. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) dır. Bu enzimler birlikte çalışarak O_2 and H_2O_2 'yi daha zararsız olan H_2O_2 ve O_2 'ye çevirirler. Ekzojen antioksidanlar ise çoğunlukla meyve ve sebzelerde bulunup vücuda dışarıdan alınırlar (55).

2.6.4. Oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar

Oksidatif stres pek çok dejeneratif hastalıkla ilişkilidir (74-76). Ateroskleroz, astım, vasküler hastalıklar, kronik obstruktif pulmoner hastalık, kalp yetmezliği, hipertansiyon, pnömoni, grip, hepatit, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve diyabet oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklardandır (77).

2.7. Diabetes Mellitus

2.7.1. Tanımı ve sınıflandırılması

Diabetes Mellitus (DM) hiperglisemi ile karakterize olup insülin sekresyonunda veya çalışmasındaki bozukluktan kaynaklanan metabolik bir hastalıktır (1). Dünya genelinde yaklaşık 382 milyon insanın, yani toplam nüfusun %8.3'ünün, diyabet olduğu tahmin edilmektedir (78).

Diyabet için 2014 yılında Amerikan Diyabet Birliği'nin yaptığı sınıflandırmaya göre; Tip 1 ve Tip 2 diyabet olmak üzere 2 ana gruba ayrılmıştır (79).

Tip 1 DM, pankreastaki Langerhans adacıklarında insülin salgılayan beta hücrelerinin kaybı sonucu oluşan tam insülin eksikliği ile karakterize olup güçlü inflamatuvar etkiye sahip kronik bir otoimmün hastalıktır (80).

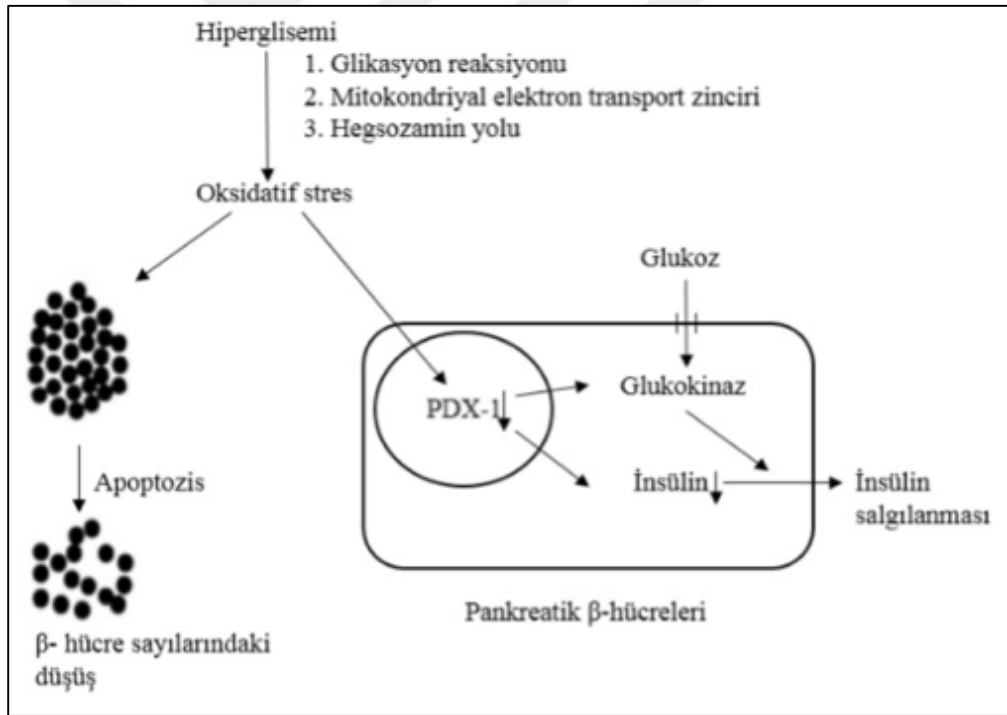
Tip 2 DM, düşük insülin üretimi ile birlikte temelde insülin direnci ile karakterizedir. Yaşam tarzı ve genetik ile ilişkilidir. Obezite, düşük fiziksel aktivite, zayıf beslenme, stres ve kentleşme gibi faktörler tip II diyabet gelişimindeki önemli faktörlerdendir. Diyabet hastalarının büyük kısmını (yaklaşık %85ini) oluşturur (81-83).

Diğer DM tipleri: Gestasyonel diyabet, diyabet sürecinde ortaya çıkıp tanısı konulan glukoz intoleransıdır (79). Malnutrisyon (yetersiz beslenme) ile ilişkili diyabet, insülin mekanizmasındaki genetik defekt ile ilişkili diyabet ve ilaç-kimyasal ile indüklenen diyabet çeşitleri de mevcuttur (79, 84).

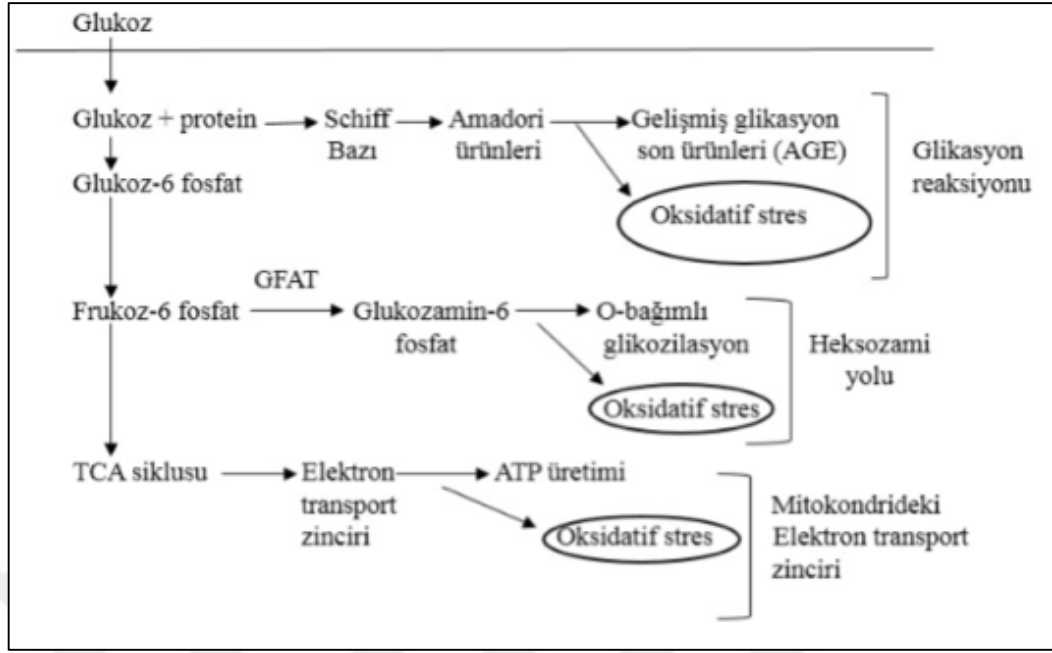
Diyabet; özellikle renal, gastrointestinal, kardiyovasküler ve seksüel fonksiyon bozuklukları olmak üzere çeşitli organlarda fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır (85). Diyabetin ve komplikasyonlarının gelişmesinde oksidatif stres önemli rol oynar. Serbest radikal üretiminin artışı ya da antioksidan savunmasının yetersizliği hastalığın ilerleyişine eşlik etmektedir (86-88).

2.7.2. Diyabete bağlı oksidatif stres ve erkek infertilitesi

1980'li yıllardan beri reaktif oksijen türlerinin diyabetteki rolü geniş çaplı tartışılan bir konu olup son yıllarda oksidatif stres ve diyabet arasındaki ilişkilerin mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmalar artmıştır (89, 90). Hiperglisemi ile uyarılan reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek miktarda üretimi sonucunda meydana gelen oksidatif stres, diyabetle ilgili önemli komplikasyonlardan sorumludur (91).



Şekil 2.13. Diyabete bağlı gelişen oksidatif stresin beta hücrelerine etkisi. (92)



Şekil 2.14. Hiperglisemideki oksidatif stresin kaynağı olan temel mekanizmalar. (92)

Diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri erkek üreme sistemindeki bozukluklardır (7, 8). Diyabetin neden olduğu oksidatif stres erkek üreme sistemine çeşitli zararlar vererek infertiliteye neden olmaktadır (8, 93, 94).

İnfertilite; en az bir sene boyunca korunmasız ilişki sonucu gebelik sağlanamayan bir üreme sistemi hastalığıdır (95). Çiftlerin %15'ten fazlasında infertilite görülmektedir. Erkek infertilitesinin ana sebeplerinden bazıları; hormonal dengesizlikler, genetik bozukluklar, varikosel, inmemiş testis ve testis torsiyonudur (37).

Diyabet, üreme çağındaki genç erkeklerin çoğunluğunu etkilemektedir (96). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile diyabetik erkeklerde infertilite olgularında artış görülmüştür. Diyabet çeşitli yollarla erkek üreme fonksiyonlarını etkiler. Spermin temel enerji kaynağı olarak kullandığı maddelerden biri olan glukoz, spermatogenez sırasında kan-testis bariyerinden pasif difüzyonla geçer ve spermin temel hücre aktiviteleri, spesifik fonksiyonları, motilitesi ve ferzilizasyon kabiliyeti için önemli role sahiptir. Dolayısıyla tübül içindeki glukoz seviyesi spermatogenezin sürekliliği için çok önemli olup diyabetteki hiperglisemik durumla meydana gelen glukoz dengesizlikleri spermatogenezin sürekliliğini bozmakta ve sperm kalitesini oldukça etkilemektedir. Yapılan çalışmalar ile diyabetli hastalarda düşük sperm hareketliliği

ve düşük sperm sayısı görülmüştür. Diyabetin spermde DNA hasarına sebep olduğu da bilinmektedir. Ayrıca diyabet, LH ve FSH salınımındaki kontrol mekanizlarını değiştirmektedir. Bu hormonal dengesizlikler hem Sertoli hücrelerini hem de spermleri olumsuz etkiler. Diyabet, hipofiz bezinden LH salınımını bozarak Leydig hücrelerinden testosteron salınımı düzeyini de azaltmaktadır (96-101)

2.7.3. Apoptozis

Apoptozis; embriyonik ve yetişkin süreçte dokulardaki hücre popülasyonunu dengede tutmak için gerekli olan programlı bir hücre ölümü çeşididir. Genellikle canlının yaşamı boyunca yarar sağlayan düzenli bir mekanizmadır.

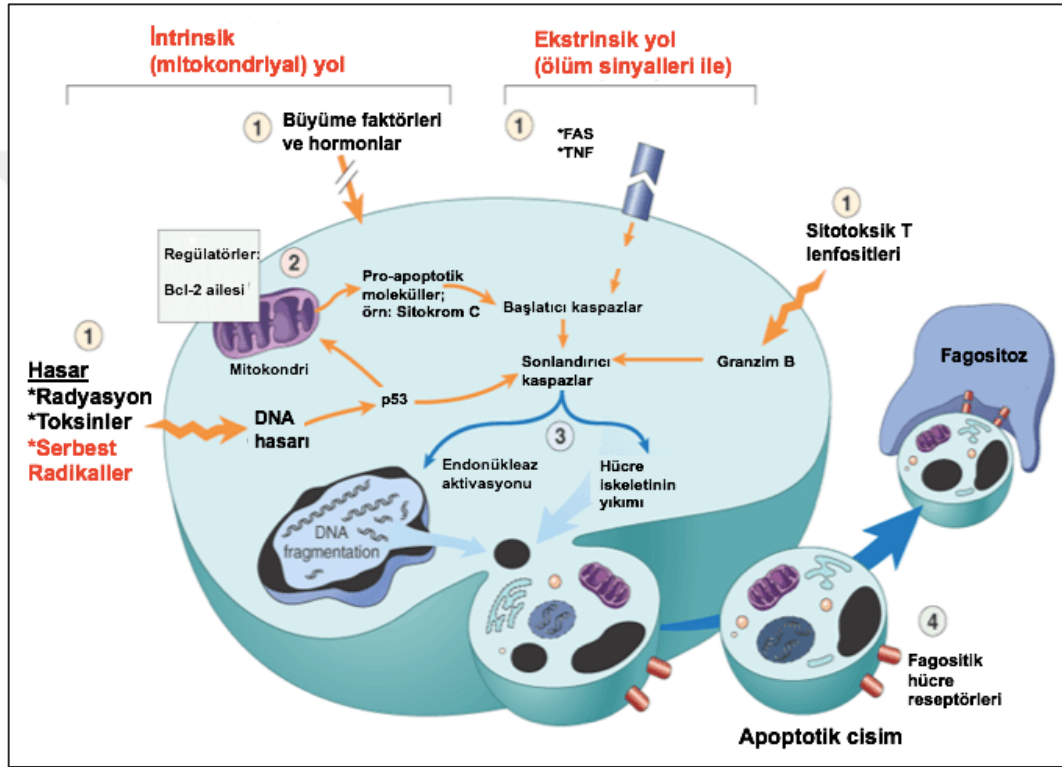
Apoptoziste meydana gelen değişimler; çekirdekte kromatin yoğunlaşması, hücrenin hacim kaybederek büzülüp küçülmesi, DNA'nın kırılması ve apoptotik cisimciklerin oluşması şeklinde özetlenebilir (102-104).

Apoptozis belli bir oranda gerçekleştiği sürece zararlı değildir ancak apoptotik denge bozulduğunda çeşitli tahribatlara ve hastalıklara yol açmaktadır. Apoptoz azalıp hücre birikimi arttığında kansere ve viral enfeksiyonlara; apoptoz artıp hücre kaybı arttığında ise Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklara neden olmaktadır. Apoptotik hücre, çekirdek materyali ve organelleri içeren küçük sitoplazmik veziküllere parçalanır. Bu veziküllere apoptotik cisim adı verilir ve bunlar fagositik hücreler tarafından hızlı bir şekilde ortadan kaldırılırlar.

Apoptozisin meydana geldiği 2 temel mekanizma vardır (Şekil 2.15). Bunlar; intrinsik yol (mitokondriyal) ve ekstrinsik yol (ölüm sinyalleri ile) olarak adlandırılır. Alternatif mekanizmalar ise Granzim B/perforin (Sitotoksik T lenfositleri ile) ve p53 yoludur (102, 103, 105-107).

Apoptozis mekanizmasında rol alan Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) proteinleri, pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar. Anti-apoptotik olanlar, sitokrom C'nin salınmasını bloke ederler. Pro-apoptotik olanlar ise (örneğin; Bax) bu salınımı teşvik ederler. Sitokrom C, mitokondriyal hücreler arası zarıdan sitoplazmaya salınarak kaspazların faaliyetlerini aktive eder. Kaspazlar, sistein-proteaz grubu enzimler olup inaktif olarak sentezlenirler. DNA onarımı ve replikasyonunda gerekli olan enzimleri inaktive ederler. Kaspazlar, başlatıcı, sonlandırıcı (öldürücü) ve inflamasyon düzenleyici kaspazlar olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9 ve 10; öldürücü kaspazlar 3, 6 ve 7;

inflamasyon düzenleyiciler ise 1, 4, 5, 12, ve 14'tür. Apoptozisi uyarıcı bir başka protein ise p53 geni tarafından kodlanan p53 proteindir. Bu protein, DNA hasar gördüğünde tamir proteinlerini harekete geçirir. Ancak DNA tamir edilemeyecek kadar zarar gördüyse apoptozisi başlatarak hücre döngüsünü düzenler. Apoptoz inhibitör proteinleri (AIP) de apoptozisi düzenleyici bir grup proteindir ve kaspaz aktivitesini inhibe ederler. Özellikle kanserde, düzensiz çalışan apoptozis proteinleri gözlenmiştir (102, 103, 105, 106, 108, 109).



Şekil 2.15. Apoptozisin mekanizmaları

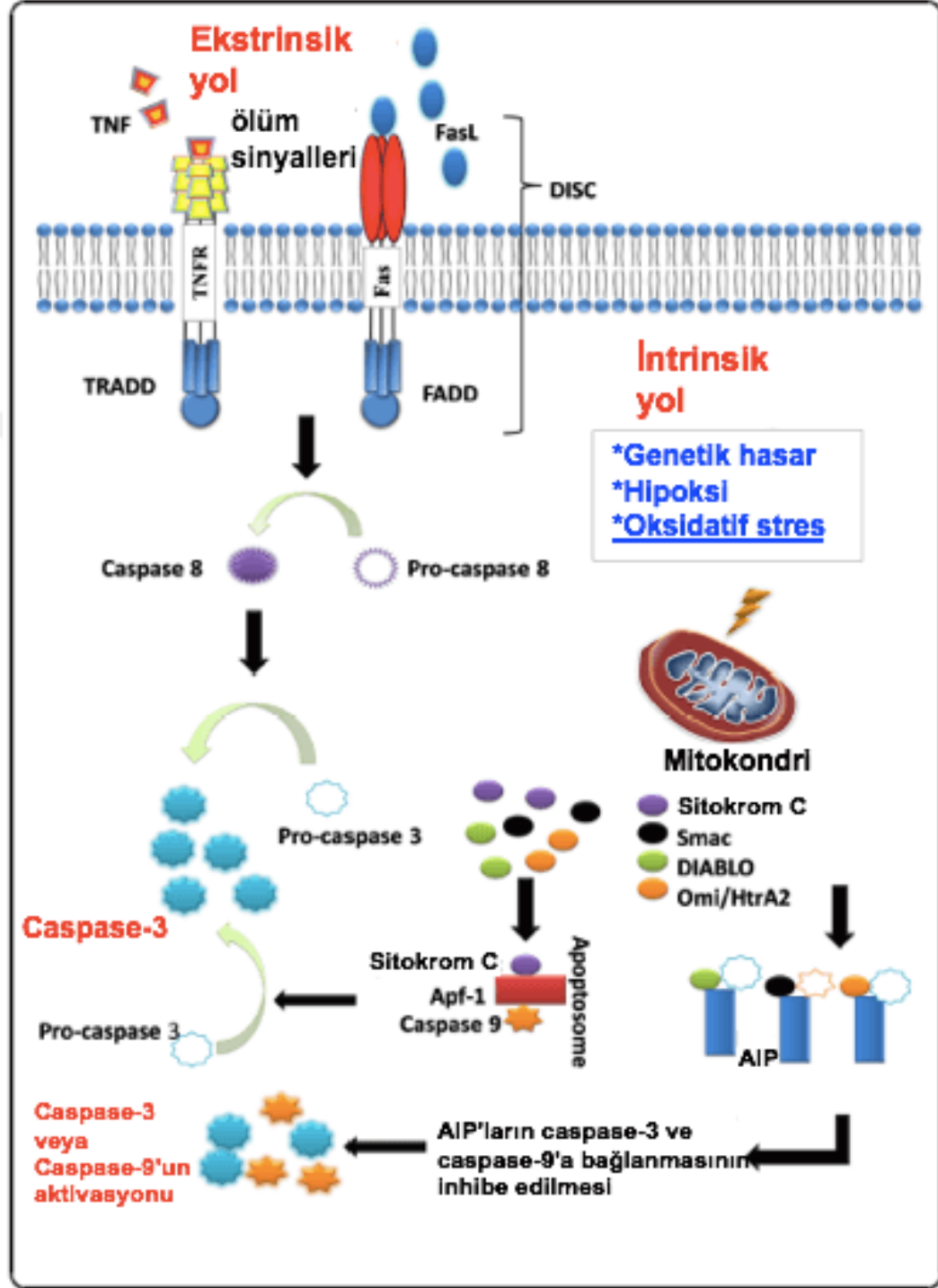
Apoptozisi belirlemede kullanılan en yaygın yöntemler immünohistokimyasal yöntemlerdir. Bunlar; Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi, Anneksin V yöntemi ve Caspase-3 işaretleme yöntemidir.

Anneksin V, apoptotik hücrenin zarındaki negatif yüklü Phosphatidylserine (PS)'e bağlanarak apoptotik hücreyi belirler.

TUNEL yönteminde, apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak işaretlenir.

Caspase-3, hem intrinsik hem ekstrinsik yol ile aktive olabilen ve hücre ölümünde rol alan bir proteindir (110) (Şekil 2.16). Caspase-3 yöntemi ile apoptotik

hücrelerde oluşan aktif caspase-3'ün immünohistokimyasal işaretlemesi yapılabilmektedir (111).



Şekil 2.16. Apoptoziste kaspaz aktivasyon mekanizması

Diyabette artmış olan serbest radikaller ve oksidatif stres ile indüklenerek izlenen yol sonucunda apoptozis meydana gelir. Diyabet, testis germ hücrelerinde apoptozisi artırarak testisin fonksiyon bozukluklarına sebep olur (112, 113).

Birçok çalışmada diyabetin testis dokusunda biyokimyasal ve histolojik açıdan çeşitli önemli değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (97, 114, 115). Bu değişiklikler; seminifer tübüllerde atrofi ve tübül duvarındaki epitelde düzensizlik, apoptozis, bazal membran kalınlığında ve interstisyel alan hacmindeki artış, tübüllerdeki sperm sayısında azalma, tübüllerde dev hücrelerin görülmesi, vakuolizasyon ve konjesyon şeklinde özetlenebilir (100, 115).

2.8. *Lycium Barbarum* Polisakkaritleri

İnsan vücudu kendi doğal antioksidanını üretir ancak serbest radikal üretimini çok yüksek olduğunda bu endojen antioksidanlar yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden vücut dışarıdan alacağı ekzojen antioksidanlara ihtiyaç duyar (116, 117). Ekzojen antioksidan takviyesi; hayvan ürünleri, meyve ve sebzelerdeki vitamin ve minerallerin alınmasıyla sağlanabilir (118). Antioksidan takviyesi endojen antioksidanların hastalık riskini düşürmesi ve engellemesi için destekleyicidir. Organizmayı oksidatif strese ve onun sebep olduğu hasarlara karşı korur. Ayrıca ROS üretimini inhibe edip engeller (119-121).

Diyabet tedavisi için kullanılan pek çok kimyasal ilaç bulunmaktadır. Ancak bu ilaçlar, uzun tedavi süreci de göz önüne alındığında, olumsuz ve ciddi yan etkilere sahiptirler. Bu yüzden günümüzde bitkisel tedavi arayışıyla yapılan çalışmalar artmakta ve büyük önem taşımaktadır (122, 123).

Araştırmacılar, doğal ürünlerde yer alan çok çeşitli aktif moleküller keşfetmişlerdir ve bu ürünlerin polisakkaritleri diyabet tedavisi için yüksek potansiyele sahip görülerek yoğun araştırma konusu haline gelmiştir (124). Doğal polisakkaritlerin Diabetes Mellitus'ta hipoglisemik etki gösterdiği olası mekanizmalar;

- 1- Plazma insülinin yükselmesi ve pankreatik glukagonun düşüşü
- 2- İnsülin duyarlılığının artışı ve insülin direncinin gelişmesi
- 3- Bağırsaktaki α -glukosidaz enzimlerinin tutulması ve karbonhidrat emiliminin azalması
- 4- Hepatik glikojenin yükselmesi ve şeker displazisinin inhibe edilmesi

- 5- Periferik dokuda glukoz kullanımının artması
- 6- Serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun temizlenmesi olarak özetlenebilir (122).

Kurt üzümü ya da Goji berry olarak da bilinen *Lycium barbarum*; Çin, Hindistan ve Asya'nın diğer bölgelerinde yaygın olarak yetişen Solanaceous familyasına ait bir çalı bitkisi türüdür. Parlak kırmızı-turuncu, elips şekilli 1-2 cm boyunda üzüm meyvesi üretmektedir.

Lycium barbarum meyvesi, Çin'de geleneksel bitkisel tıp alanında 2 bin yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalar ile *Lycium barbarum*'un diyabete, inflamasyona ve kanser gibi rahatsızlıklara karşı birçok biyolojik etki sergilediği gösterilmiştir (28, 125-128).

Lycium barbarum'un temel aktif bileşenleri; polisakkaritler, flavonoidler ve karotenoidlerdir. Bu aktif bileşenler içinde, yüksek antioksidan özelliği sebebiyle, en çok çalışılan polisakkaritlerdir (128).

Lycium barbarum polisakkaritleri (LBP); hipoglisemik, antioksidan, anti-tümör, immün düzenleyici etkilere sahiptirler. Ayrıca üreme fonksiyonunda koruyucu etkiye sahip olup fertilite kabiliyetini artırma özellikleri de vardır. Son yıllarda araştırmacılar LBP'nin oksidatif stresteki koruyucu etkisi üzerine yoğunlaşmışlardır (26, 127).

2015 yılında yapılan bir çalışmada; testis torsiyonu oluşturulan sıçanlarda iskemi reperfüzyon sonucu testis dokusundaki hasara karşı *Lycium barbarum*'un antioksidan etkisinin koruyucu özelliği gösterilmiştir (25). Yakın zamanda yapılan diğer çalışmalarda ise *Lycium barbarum* polisakkaritlerinin, Bisphenol A ile indüklenen testis hasarına koruyucu etkisi, oksidatif strese karşı koruyucu etkisi ve diyabet oluşturulan farelerde iyileştirici etkisi gösterilmiştir (26). Dolayısıyla *Lycium barbarum* polisakkaritleri hem antioksidan hem hipoglisemik hem de üreme sistemi için olumlu etkilere sahip olduğundan diyabete bağlı infertilitede ve oksidatif stres hasarında tedavi potansiyeli yüksek bir madde olarak dikkat çekmektedir (27).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2016/04 no'lu karar ile onay alınarak (Bkz. Ek-1) Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütüldü. Ayrıca Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2016.08.03.1098 proje numarası ile desteklendi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan deney hayvanları AİBÜ Deney Hayvanları Merkezi'nden (DEHAM) temin edildi. Hayvanlar çalışma başlayıncaya kadar ve çalışma süresince AİBÜ DEHAM'da, standart koşullarda 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne uygun $25\pm3^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamda tutularak ad libitum besin ve su ile beslendiler. Çalışmaya 40 adet (3-4 aylık) sağlıklı erkek Wistar Albino sıçan ile başlandı ancak diyabetin komplikasyonlarına bağlı ölümler dolayısıyla 31 örnek ile tamamlandı.

3.2. Deney Grupları

Denekler rastgele seçilerek; Grup 1: Sham kontrol grubu (n=6), Grup 2: LBP kontrol grubu (sadece LBP) (n=6), Grup 3: Diyabet grubu (STZ) (n=9) ve Grup 4: Tedavi grubu (STZ+LBP) (n=10) olmak üzere 4 ayrı gruba ayrıldı. Deneye başlanmadan önce sıçanlardan alınan kan örneğiyle kan-glukoz düzeylerine bakılarak normal değerlere sahip denekler çalışmaya alındı. Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla Streptozotosin (STZ) (Sigma Aldrich, CAS no: 18883-66-4) kullanıldı. Grup 3 ve 4'ü oluşturan sıçanlara sitrat tamponu (0.1 M pH:4.5) içerisinde eritilen STZ tek doz 55mg/kg intraperitoneal olarak enjekte edildi. STZ enjeksiyonu bittikten 48 saat sonra, kuyruk ucu kesilerek elde edilen kan örneğiyle kan-glukoz düzeyleri ölçülerek diyabet olup olmadıkları tespit edildi. Kan-glukoz değerleri 250 mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Grup 4'ü oluşturan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildikten sonra *Lycium barbarum* polisakkaritleri (LBP) 15 gün süreyle günde 1'er kez 200 mg/kg gavaj yoluyla verildi. 15 günün sonunda, hayvanlar belirtilen dozlarda uygulanan anestezi maddelerle muamele edilip sakrifiye edildi. Dokular %10'luk formaldehite alınıp tespit edildi. Sperm yayma işlemi için epididim örnekleri PBS'e (phosphate buffered saline) konuldu.

3.3. Diyabet Oluşturma Modeli

Deneyisel diyabet oluşturmak amacıyla Streptozotosin (STZ) (Sigma Aldrich, CAS no: 18883-66-4) kullanıldı. Diyabet oluşturulurken, STZ enjeksiyonundan 12 saat önce sıçanlar hiperglisemiye karşın aç bırakıldılar. Enjeksiyon öncesi sıçanlar tartılıp, açlık kan-glukoz değerleri kuyruk ucu kesilerek elde edilen kandan ACCU-CHECK GO cihazı kullanılarak ölçüldü. Ayrıca sıçanların vücut ağırlığına göre STZ çözelti miktarı hesaplandı. STZ çözeltisi; pH sı 4.5 olarak ayarlanan 0.1 molar sitrat tampon içinde çözülerek hazırlandı. Tek doz 55 mg/kg STZ intraperitoneal olarak uygulandı. Enjeksiyondan sonraki 24 saatte ise sıçanların su kaplarına hipoglisemik çok nedenli ölümleri engellemek için %30'luk dekstroz konuldu. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kuyruk ucundan alınan kandan kan-glukoz değerleri ölçülerek diyabet tayini yapıldı. Kan-glukoz değeri 250mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi.

3.4. *Lycium Barbarum* Polisakkaritlerinin Hazırlanması

Ticari olarak satılan kurutulmuş kurt üzümü (*Lycium barbarum*) meyvesinden toplam 2 kg alındı. 250 gr kurutulmuş meyve blender ile toz haline getirildi. Yağ kısımlarını ayırmak için; kloroform: metanol (2:1) ile iki kere; oligosakkaritleri ayırmak için ise %80 etanol ile 80°C'de refluxed edildi. Kalan kısmın dört katı kadar sıcak su eklenerek dört defa ekstre edildi. Sonra süzülen sıvı kısım birleştirilerek rotaride 60°C'de konsantre edilip sırasıyla %95 etanol, %100 etanol ve aseton ile çöktürme işlemi yapıldı. Çöken kısım toplanarak vakum ile kurutuldu. Kurutulmuş bu kısım polisakkarit kısmına ait olup özüt taze hazırlanarak kullanıldı.



şekil 3.1. *Lycium barbarum* polisakkariterinin hazırlanışı

3.5. Gavaj Uygulaması

LBP kontrol ve tedavi grubunu oluşturan sıçanlara, insulin enjektörü ve gavaj iğnesi yardımıyla, 15 gün süreyle günde 1'er kez 200 mg/kg LBP gavaj yoluyla verilmiştir.

3.6. Işık Mikroskopik İncelemeler

1. Dokular %10'luk formaldehit ile tespit edildi.
2. Akan musluk suyu altında yıkandı.
3. %70'lik alkolde iki saat bekletildi.
4. %80'lik alkolde iki saat bekletildi.
5. %96'lık alkolde bir saat bekletildi.
6. %96'lık alkolde bir saat bekletildi.
7. %100'lük alkolde bir saat bekletildi.
8. %100'lük alkolde bir saat bekletildi.
9. Ksilol I'de bir saat bekletildi.
10. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
11. Eşit miktarlarda hazırlanan Ksilol-Parafin karışımında 64°C etüvde 30 dakika bekletildi.
12. Parafin I'de 64°C etüvde üç saat bekletildi.
13. Parafin II'de 64°C etüvde üç saat bekletildi.
14. Takip edilen dokular bloklama kaplarında parafine gömülerek etiketlendi.

Hazırlanan bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom ve Leica mikrotom cihazı ile 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin ve Masson Üçlü boyaması; apoptozisi göstermek için TUNEL ve Caspase-3, Crisp-1 protein ekspresyonunu göstermek için Crisp-1 antikör ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı.

3.6.1. Hematoksilen-eozin boyaması

1. Parafin kesitler 60-64°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
2. Ksilol I'de 2 dakika bekletildi.
3. Ksilol II'de 2 dakika bekletildi.
4. İki defa %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi.
5. İki defa %96'lık alkolde 1'er dakika bekletildi.
6. Akan suda yıkandı.

7. Hematoksilen boyasında 4-5 dakika bekletildi.
8. Akan suda yıkandı.
9. Asit alkole iki kere daldırıldı.
10. Akan suda yıkandı.
11. Amonyaklı suda 10 saniye bekletildi.
12. Akan suda yıkandı.
13. %80'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
14. Eozin boyasında 1 dakika bekletildi.
15. İki defa %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
16. İki defa %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
17. Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.6.2. Masson'un üçlü boyaması

1. Parafin kesitler 60-64°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
2. Ksilol I'de 2 dakika bekletildi.
3. Ksilol II'de 2 dakika bekletildi.
4. İki defa %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi.
5. İki defa %96'lık alkolde 1'er dakika bekletildi.
6. Akan suda yıkandı.
7. Eşit miktarda A ve B solüsyonlarının karışımıyla hazırlanan Weigert's Hematoksilen dokuların üzerine damlatılarak 20 dakika bekletildi.
8. Suda yıkandı.
9. Ponceau Fuchsin damlatılarak 5 dakika bekletildi.
10. Distile su ile yıkandı.
11. Phosphotungstic asit damlatılarak 10 dakika bekletildi.
12. Yıkamadan Metil Blue damlatıldı 5-10 dakika bekletildi.
13. Distile su ile yıkandı.
14. İki defa %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
15. İki defa %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
16. Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Boyama prosedüründe boyama kitine (Atom Scientific LTD, Code: RRSK20-100) ait olan protokole uyuldu.

3.7. İmmunohistokimyasal İncelemeler

3.7.1. TUNEL işaretleme

Dokudaki apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi kullanıldı. Parafin bloklardan adezyonlu (polizinli) lamlara 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler boyama işleminden bir gece önce 37 derecelik etüvde bekletildi. Ertesi sabah 30 dakika 64°C'lik etüvde bekletildi.

1. İki kere 5'er dakika Ksilol'de bekletildi.
2. %100'lük alkolde 5 dakika bekletildi.
3. %96'lık alkolde 3 dakika bekletildi.
4. %70'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
5. %50'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
6. PBS'te 5 dakika bekletildi.
7. Dokuların etrafı pap-pen ile çizildi.
8. Proteinaz K damlatılarak 15 dakika bekletildi.
9. İki kere PBS ile yıkandı.
10. %3'lük Hidrojen peroksit hazırlandı (3 ml H2O2 +27 ml PBS) ve kesitlerin üzerine damlatılarak 5 dakika bekletildi.
11. İki kere PBS ile yıkandı.
12. Dengeleyici buffer damlatılarak 30 dakika bekletildi.
13. Taze olarak Tdt hazırlandı;
77 mikrolitre Reaksiyon buffer
33 mikrolitre Tdt enzim
Toplam 110 mikrolitre (3 preparat için) şeklinde hesaplandı.
14. Hazırlanan Tdt damlatılarak üzeri parafilm ile kapatıldı ve 37°C etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı.
15. Üç kere PBS ile yıkandı.
16. Stop/Wash buffer damlatılarak 10 dakika bekletildi.
17. Üç kere PBS ile yıkandı.
18. Anti-Digoxigenin peroksit damlatılarak 30 dakika bekletildi.
19. Üç kere PBS ile yıkandı.
20. Taze hazırlanan DAB solüsyonu damlatılarak karanlık ortamda 30 saniye bekletildi.

21. Distile su ile yıkandı.
22. Taze olarak 1:3 oranında hematoksilen distile su karışımı hazırlandı ve kesitlere damlatılarak 15 saniye bekletildi.
23. Distile su ile yıkandı.
24. %70'lik alkolde 30 saniye bekletildi.
25. %96'lık alkolde 30 saniye bekletildi.
26. %100'lük alkolde 1 dakika bekletildi.
27. Ksilol I'de 1 dakika bekletildi.
28. Ksilol II'de 1 dakika bekletildi.

Ksilol'den çıkarılan kesitler entellan damlatılıp lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda değerlendirilecek olan preparatlar, boyanın solmaması için lam kutusunda muhafaza edildi. TUNEL kiti olarak orjinal MERCK Millipore ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (cat no: S7100) kullanıldı.

3.7.2. Crisp-1 immün işaretleme

Parafin bloklardan adezyonlu (polizinli) lamlara 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler boyama işleminden bir gece önce 37 derecelik etüvde bekletildi. Ertesi sabah 30 dakika 64°C'lik etüvde bekletildi.

1. İki kere 5'er dakika Ksilol'de bekletildi.
2. %100'lük alkolde 5 dakika bekletildi.
3. %96'lık alkolde 3 dakika bekletildi.
4. %70'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
5. %50'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
6. Distile suda 3 dakika bekletildi.
7. Kesitler sonra PBS'e alındı.
8. Taze hazırlanan Citrate Buffer (x10) solüsyonuna alınan kesitler 360°C'de 5 dakika kaynatıldı.
9. Solüsyon seviyesi kontrol edilip azaldıysa solüsyon eklenerek 5 dakika daha 360°C'de kaynatıldı.
10. Soğuduktan sonra dokuların etrafı pap-pen ile çizildi ve kurumamaları için PBS damlatıldı.
11. Hidrojen peroksit damlatılarak 15 dakika bekletildi.
12. İki kere PBS ile yıkandı.

13. Serum block damlatılarak 10 dakika bekletildi.
14. Crisp-1 (MyBioSource; cat no: MBS2032807) antikoruna göre hesaplama yapılarak Crisp-1 antikor + diluent karışımı taze olarak hazırlandı.
15. Kesitlere Crisp-1 antikor damlatılarak üzeri parafilm ile kapatıldı ve +4°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
16. Ertesi gün kesitlerin parafilmli dikkatle çıkarılarak iki kere PBS ile yıkandı.
17. Pap-pen kontrol edildi, silinenlerin tekrar etrafı çizildi.
18. Biotinylated antikor (sekonder) damlatılarak 30 dakika bekletildi.
19. PBS ile yıkandı.
20. Streptavidin damlatılarak 15 dakika bekletildi.
21. PBS ile yıkandı.
22. Taze hazırlanan DAB solüsyonu damlatılarak karanlık ortamda 30 saniye bekletildi.
23. Distile su ile yıkandı.
24. Taze olarak 1:3 oranında hematoksilin distile su karışımı hazırlandı ve kesitlere damlatılarak 15 saniye bekletildi.
25. Distile su ile yıkandı.
26. %50’lik alkolde 1 dakika bekletildi.
27. %70’lik alkolde 1 dakika bekletildi.
28. %96’lık alkolde 1 dakika bekletildi.
29. %100’lük alkolde 1 dakika bekletildi.
30. Ksilol I’de 1 dakika bekletildi.
31. Ksilol II’de 1 dakika bekletildi.

Ksilol’den çıkarılan kesitler entellan damlatılıp lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda değerlendirilecek olan preparatlar, lam kutusunda muhafaza edildi.

3.7.3. Caspase-3 immün işaretleme

Parafin bloklardan adezyonlu (polizimli) lamlara 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler boyama işleminden bir gece önce 37 derecelik etüvde bekletildi. Ertesi sabah 30 dakika 64°C’lik etüvde bekletildi.

1. İki kere 5’er dakika Ksilol’de bekletildi.
2. %100’lük alkolde 5 dakika bekletildi.

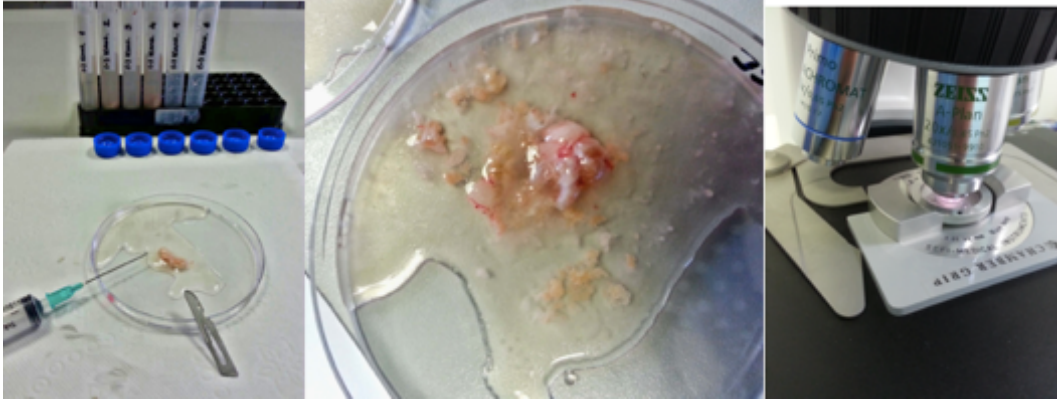
3. %96'lık alkolde 3 dakika bekletildi.
4. %70'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
5. %50'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
6. Distile suda 3 dakika bekletildi.
7. Kesitler sonra PBS'e alındı.
8. Taze hazırlanan Citrate Buffer (x10) solüsyonuna alınan kesitler 360°C'de 5 dakika kaynatıldı.
9. Solüsyon seviyesi kontrol edilip azaldıysa solüsyon eklenerek 5 dakika daha 360°C'de kaynatıldı.
10. Soğuduktan sonra dokuların etrafı pap-pen ile çizildi ve kurumamaları için PBS damlatıldı.
11. Hidrojen peroksit damlatılarak 15 dakika bekletildi.
12. İki kere PBS ile yıkandı.
13. Serum block damlatılarak 10 dakika bekletildi.
14. Caspase-3 (Thermo Fisher Scientific; cat no: PA5-16335) antikoru için 1:100 dilüsyon oranına göre hesaplama yapılarak Caspase-3 antikor + diluent karışımı taze olarak hazırlandı.
15. Kesitlere Caspase-3 antikor damlatılarak üzeri parafilm ile kapatıldı ve +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
16. Ertesi gün kesitlerin parafilmi dikkatle çıkarılarak iki kere PBS ile yıkandı.
17. Pap-pen kontrol edildi, silinenlerin tekrar etrafı çizildi.
18. Biotinylated antikor (sekonder) damlatılarak 30 dakika bekletildi.
19. PBS ile yıkandı.
20. Streptavidin damlatılarak 15 dakika bekletildi.
21. PBS ile yıkandı.
22. Taze hazırlanan DAB solüsyonu damlatılarak karanlıkta 30 saniye bekletildi.
23. Distile su ile yıkandı.
24. Taze olarak 1:3 oranında hematoksilen distile su karışımı hazırlandı ve kesitlere damlatılarak 15 saniye bekletildi.
25. Distile su ile yıkandı.
26. %50'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
27. %70'lik alkolde 1 dakika bekletildi.

28. %96'lık alkolde 1 dakika bekletildi.
29. %100'lük alkolde 1 dakika bekletildi.
30. Ksilol I'de 1 dakika bekletildi.
31. Ksilol II'de 1 dakika bekletildi.

Ksilol'den çıkarılan kesitler entellan damlatılıp lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda değerlendirilecek olan preparatlar, lam kutusunda muhafaza edildi.

3.8. Semen Analizi (Spermiyogram)

Semen analizi için, PBS içerisindeki kauda epididimden tiftikleme yöntemi ile açığa çıkarılan spermiler, Makler sperm sayma kamerası (Makler counting chamber sefi- medical instruments) kullanılarak ışık mikroskopunda 20x büyütmede sayıldı.



Şekil 3.2. Spermiyogram aşamaları

Semen analizinde sayı, hareketlilik ve morfoloji parametreleri incelendi. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kriterlerine göre;

- a-İleri Hızlı hareketli
 - b-İleri Yavaş hareketli
 - c-Yerinde hareketli
 - d-Hareketsiz
- olarak sınıflandı.

3.8.1. Anilin mavisi boyaması

Asidik Anilin mavisi boyaması, sperm kromatin kondensasyonunun değerlendirilmesi için kullanılmaktadır.

1. PBS içerisindeki epididim dokusundan tiftikleme yöntemi ile açığa çıkarılan

- spermlerden birer damla lamlara damlatılarak yayma yapıldı.
2. Sperm yayma preparatları kurutulduktan sonra %3'lük gluteraldehit'te 30 dakika bekletilip fikse edildi.
 3. Preparatlar Anilin mavisi (pH:3,5) boyasında 10 dakika bekletildi.
 4. İki kere PBS'te yıkandı ve kurumaya bırakıldı.
 5. Preparatlar ışık mikroskopunda 100x büyütmede immersiyon yağı kullanılarak incelendi.

3.9. Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal analizler için, anestezi altındaki sıçanlardan vena kava inferior ve kalpten kan örnekleri alındı. Sonrasında aort kesilerek sakrifikasyon gerçekleştirildi. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı 5 ml'lik jelli vakumlu serum separator tüpleri içerisine konularak 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serum kısımları, ependorf tüplere alınarak çalışılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi. Biyokimyasal analizlerin yapılacağı gün kademeli olarak çözdürülen serum örneklerinde; Testosteron (T) (Elabscience, Catalog no: E-EL-0072), Follikül Uyarıcı Hormon (FSH) (Elabscience, Catalog no: E-EL-R0391) ve oksidatif stres parametresi olan malondialdehit (MDA) (Elabscience, Catalog no: BC0025) düzeylerine bakıldı. Bu parametrelerin analizinde 'Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi' (ELISA) yöntemi ve thiobarbituric acid (TBA) metodu kullanıldı. Analizlerde kullanılan kitler orjinal Elabscience (Elabscience Biotechnology Co. Ltd; WuHan; P.R.C.) kitleri olup üretici firmanın belirttiği prosedüre uygun olarak kullanıldılar. Sonuçlar; Testosteron ve FSH için ng/ml, MDA için ise nmol/ml olarak ifade edildi.

3.10. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS (IBM Statistics for Mac Os, Version 21.0) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. İki bağımsız grup arasında, non-parametrik (normal olmayan) değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testi kullanıldı. Tüm gruplar arasındaki fark için non-parametrik verilerin karşılaştırılmasında ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. Parametrik veriler için One-Way ANOVA testi uygulandı. Sonuçlar, anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ kabul edilerek değerlendirildi.

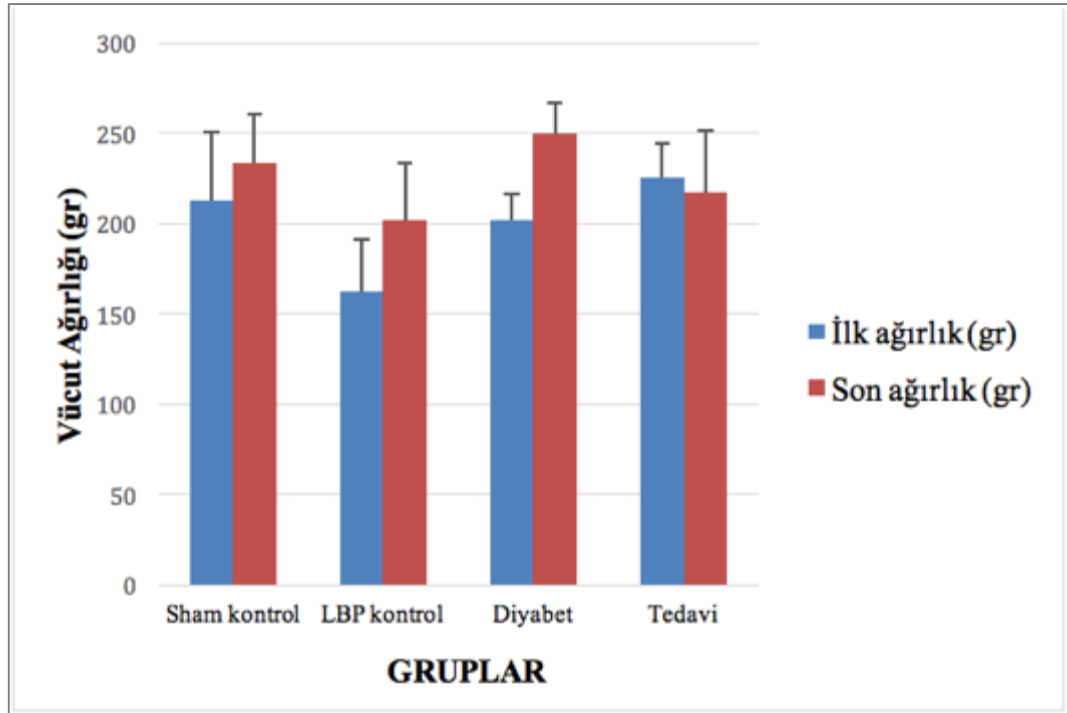
4. BULGULAR

Deney öncesi ve sonrası tartılan ratların vücut ağırlıkları Tablo 4.1 ve Grafik 4.1’de gösterilmiştir. Diyabet grubundaki deneklerin ilk ve son ağırlıkları arasında anlamlı fark görüldü ($p=0.000$, $p\leq 0.05$). Diğer gruplardaki deneklerin ilk ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$). Tedavi grubundaki deneklerin deney sonunda kilo verdikleri gözlemlendi ancak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Ayrıca deneysel diyabet oluşturulan ratlarda poliüri gözlemlendi.

Tablo 4.1. Grupların ilk ağırlık ve son ağırlık değerleri

Gruplar	Sham kontrol ($\pm$ SD)	LBP kontrol ($\pm$ SD)	Diyabet ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
İlk ağırlık (gr)	213,17 $\pm$ 37,23	162,00 $\pm$ 29,10	201,89 $\pm$ 14,22	225,10 $\pm$ 18,80
Son ağırlık (gr)	233,33 $\pm$ 27,48	201,67 $\pm$ 31,68	250,11 $\pm$ 16,49	217,20 $\pm$ 34,10



Grafik 4.1. Grupların ilk ve son ağırlıklarına ait grafik

Deneysel diyabet oluşturulan iki grupta STZ enjeksiyonundan önce ölçülen açlık kan glukoz değerleri, 48 saat sonra diyabet tayini yapılmak için ölçülen kan glukoz değerleri ve deney sonunda sakrifiye öncesi ölçülen kan glukoz değerleri Tablo 4.2.'de verilmiştir.

48 saat sonra ölçülen kan glukoz değerleri 250 mg/dl ve üstü olan denekler diyabet olarak kabul edildi ve deney sonunda da sakrifiye öncesi değerlere göre diyabetin devam ettiği, değerlerin 250 mg/dl ve üstü olduğu tespit edildi.

Tablo 4.2. Grupların kan glukoz değerleri

Gruplar	Diyabet ($\pm$SD)	Tedavi ($\pm$SD)
Açlık kan glukoz (STZ öncesi) (mg/dL)	102,89 $\pm$ 13,99	98,90 $\pm$ 6,24
Kan glukoz (STZ'den 48 saat sonra) (mg/dL)	488,22 $\pm$ 69,61	490,40 $\pm$ 68,23
Kan glukoz (Sakrifikasyon öncesi) (mg/dL)	349,22 $\pm$ 45,77	367,00 $\pm$ 116,45

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

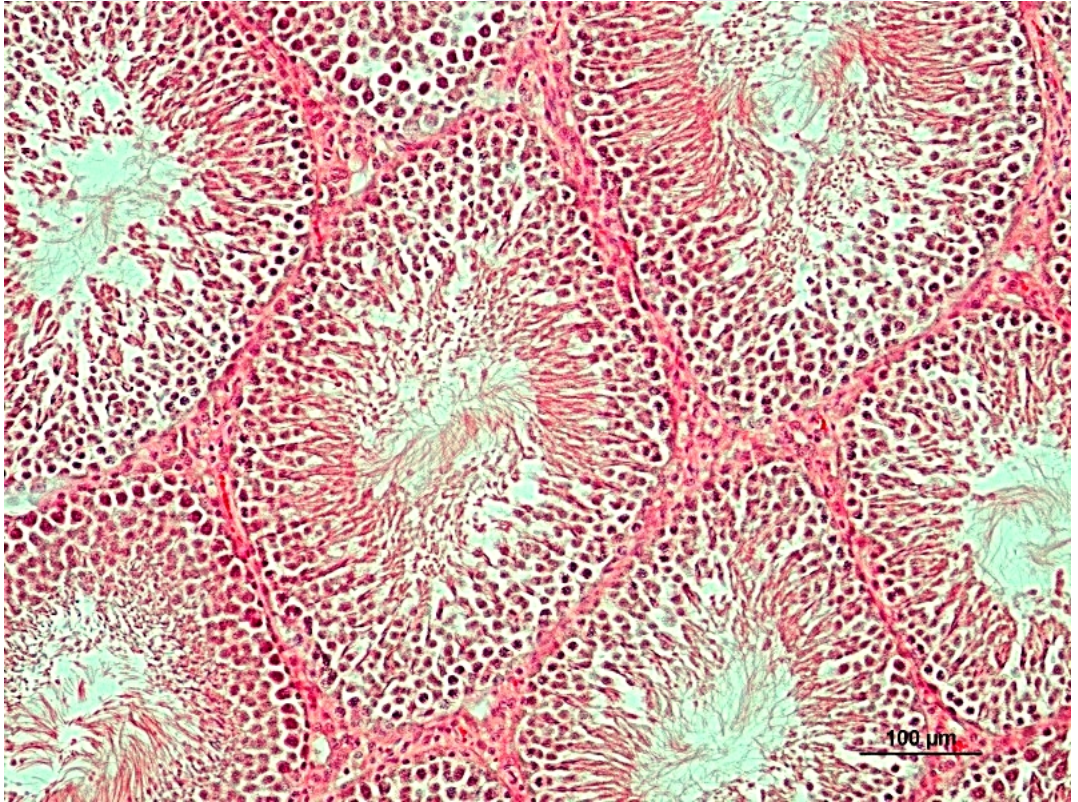
4.1.1. Histolojik bulgular

Sham kontrol grubuna ait testis dokularında herhangi bir yapısal bozukluk görülmedi; seminifer tübüllerin ve spermatogenik hücrelerin yapısal bütünlüklerini koruduğu görüldü. Diyabet grubuna ait testis dokularında seminifer tübüller içerisinde vakuol oluşumu, intertübüler alanda bağ dokusu artışı ve damarlarda konjesyon gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül lümeninde hücre döküntüleri ve intertübüler alanlarda ödem görüldü. Tedavi grubuna ait testis dokularında genel yapısal bütünlük ve intertübüler bağ dokusu sham kontrol grubuyla benzer şekilde görüldü.

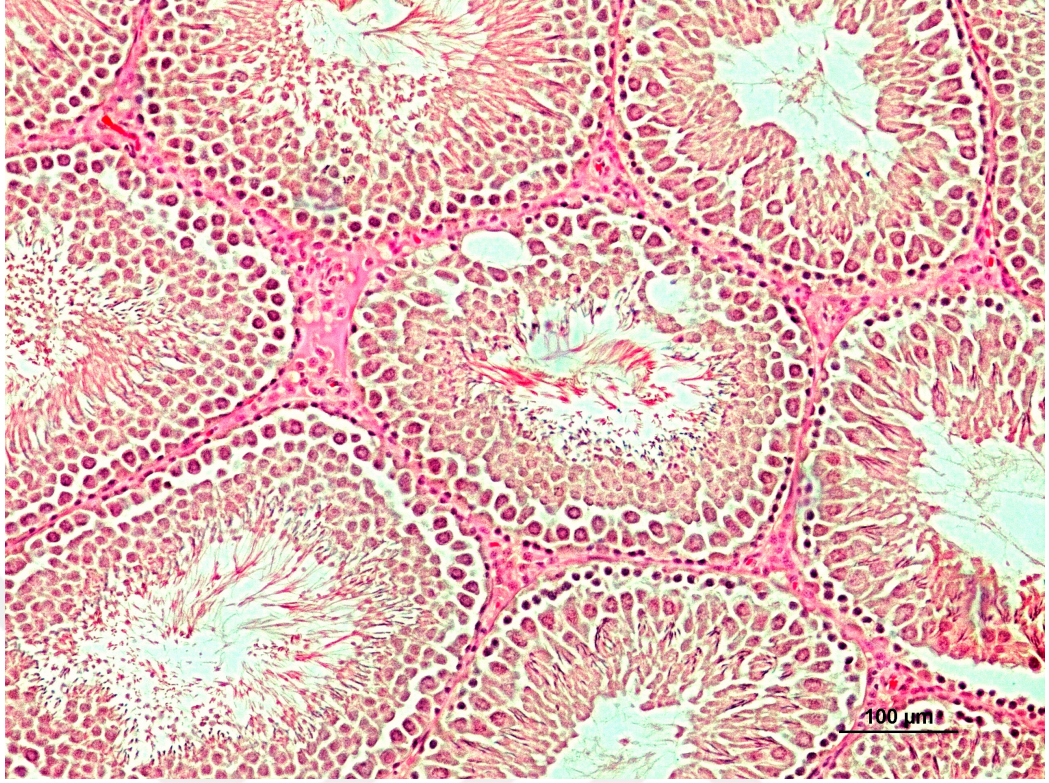
Sham kontrol ve diyabet gruplarının epididimis dokuları arasında herhangi bir fark görülmedi, tübül yapıları normal ve tübül içi sperm yoğunluğu birbirine benzer şekilde gözlemlendi.



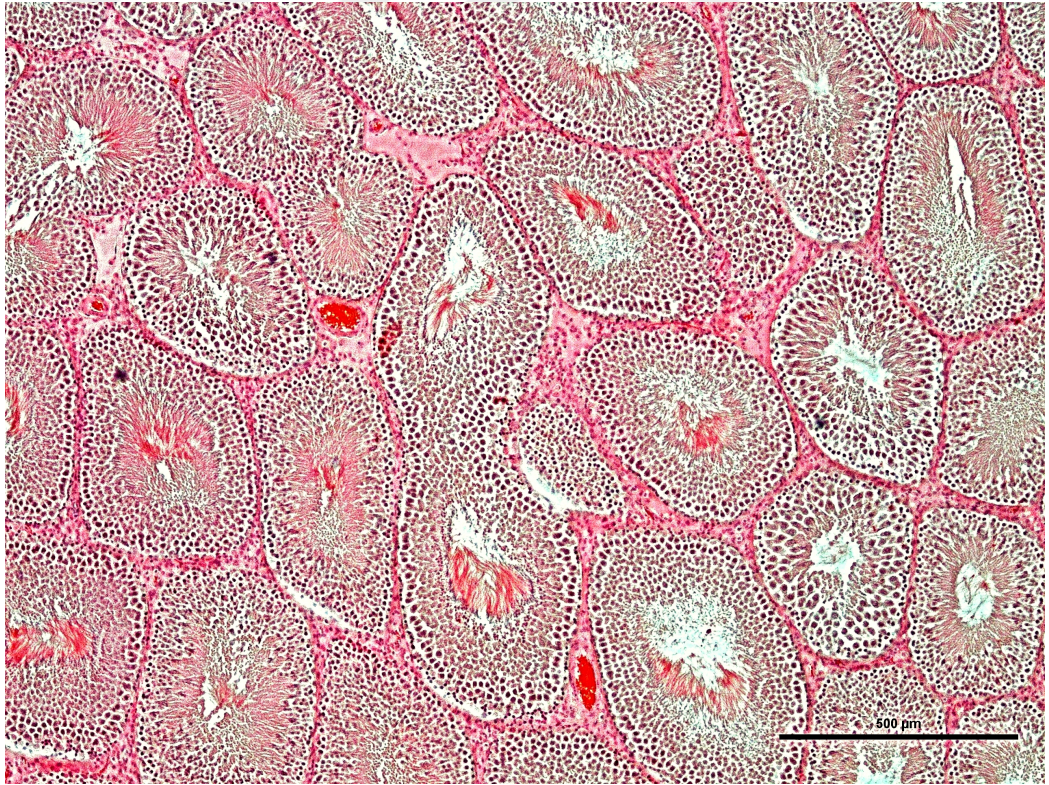
Şekil 4.1. Sham kontrol grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



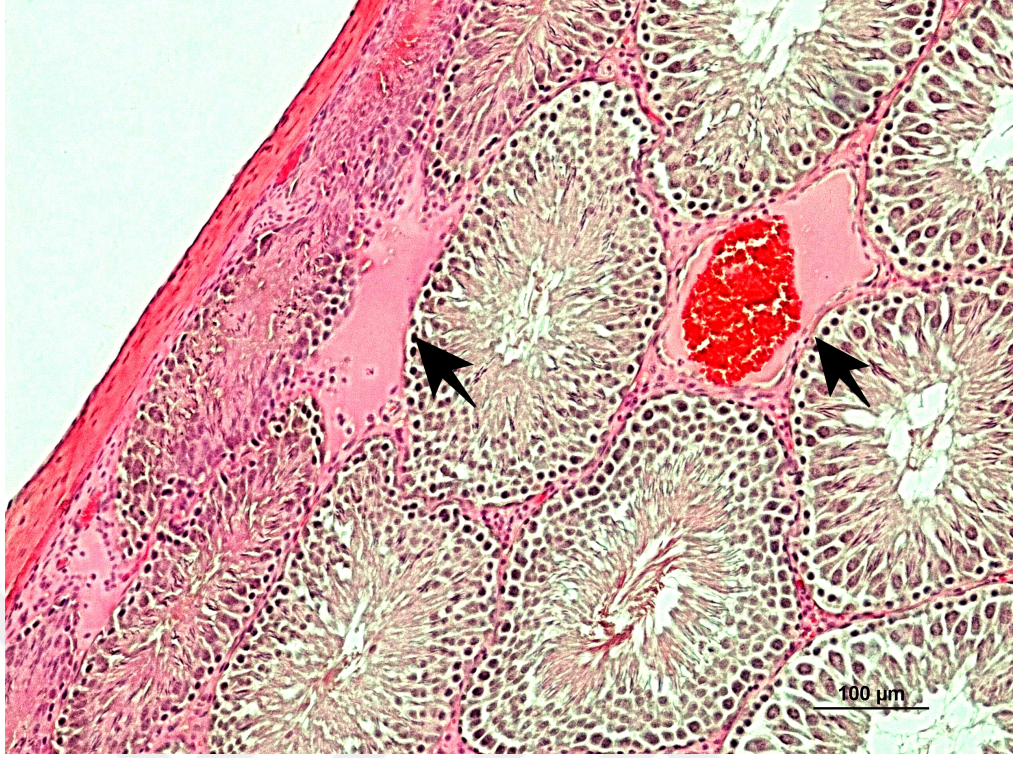
Şekil 4.2. LBP kontrol grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



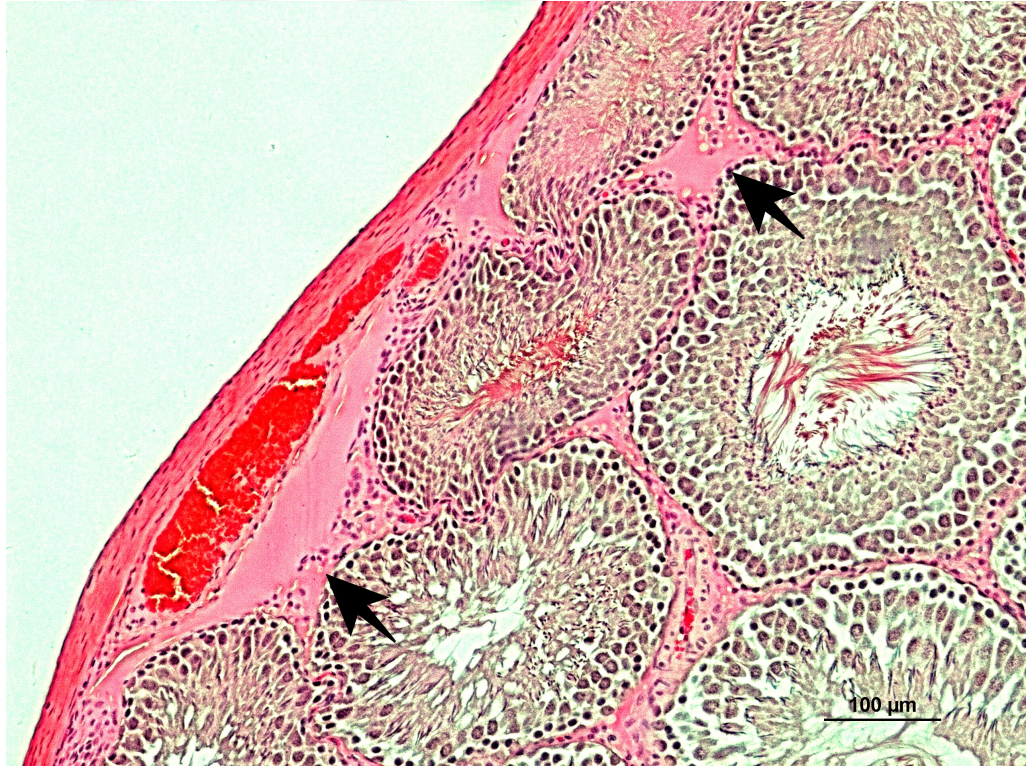
Şekil 4.3. İntertübüler bağ dokusunda artış (*) ve vakuol yapıları (→), diyabet grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



Şekil 4.4. Diyabet grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 4x



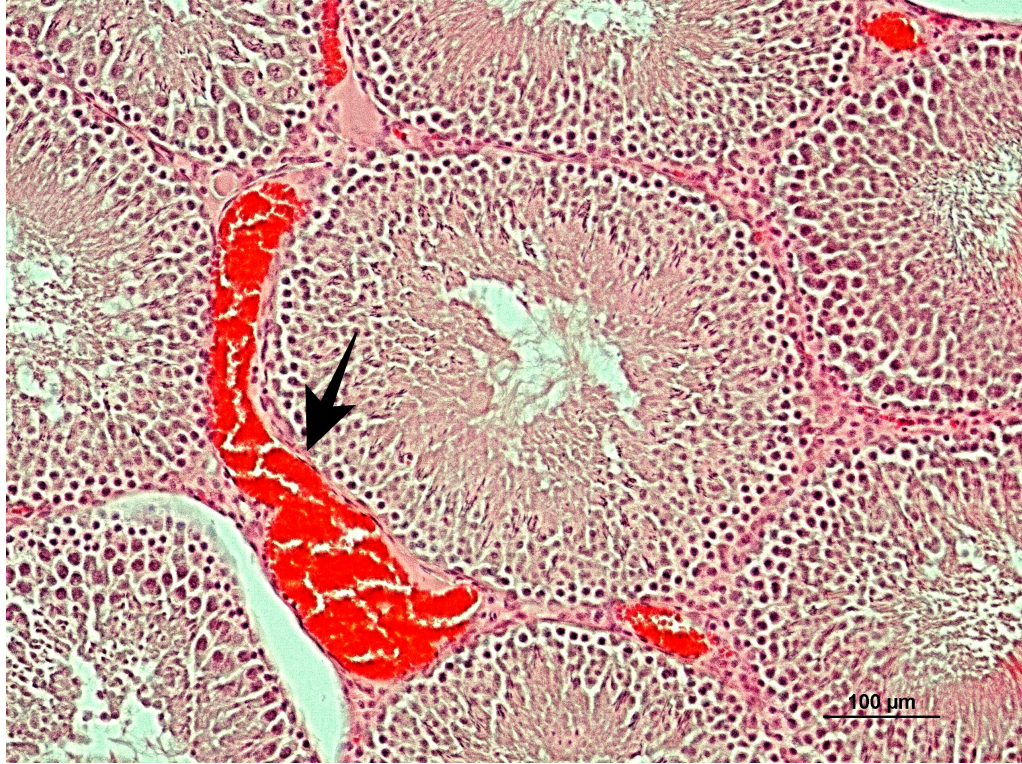
Şekil 4.5. İntertübüler alanlarda ödem ve konjesyon (→) Diyabet grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



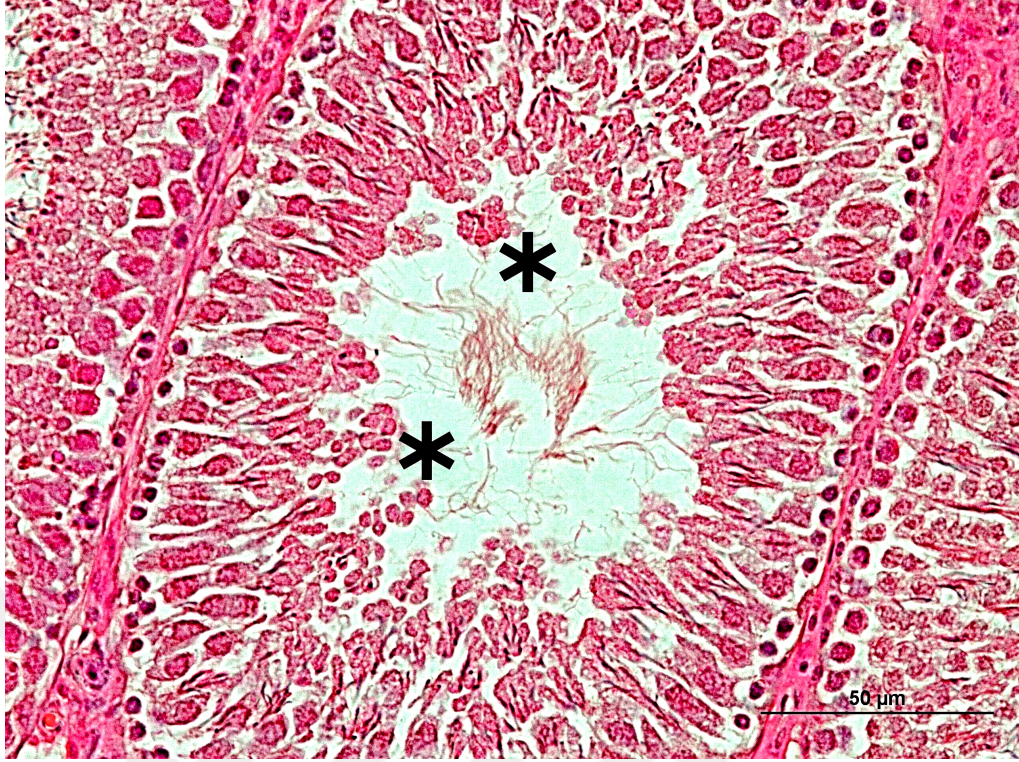
Şekil 4.6. İntertübüler alanlarda ödem (→) Diyabet grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



Şekil 4.7. İntertübüler alanlarda konjesyon (→) Diyabet grubu, Hematoksilen-Eozin Boyaması,10x



Şekil 4.8. İntertübüler alanlarda konjesyon (→) Diyabet grubu, Hematoksilen-Eozin Boyaması,10x



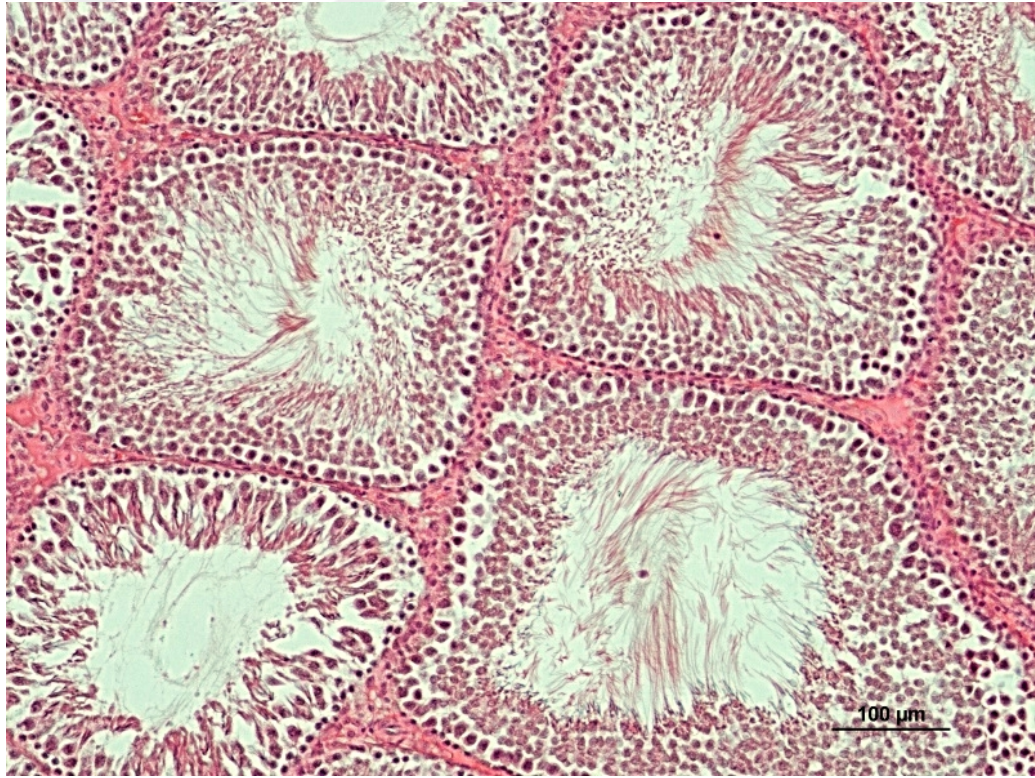
Şekil 4.9. Seminifer tübül lümeninde hücre döküntüsü (*), Diyabet grubu, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 20x



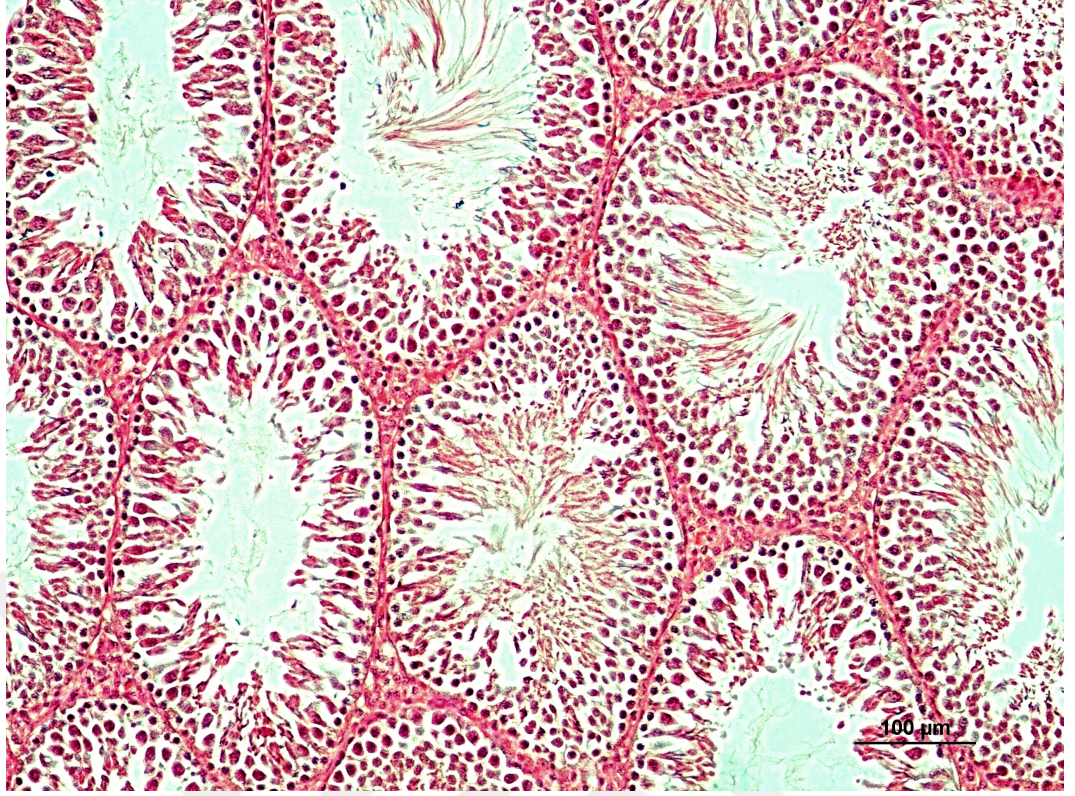
Şekil 4.10. Seminifer tübül lümeninde hücre döküntüsü (*), Diyabet grubu, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 20x



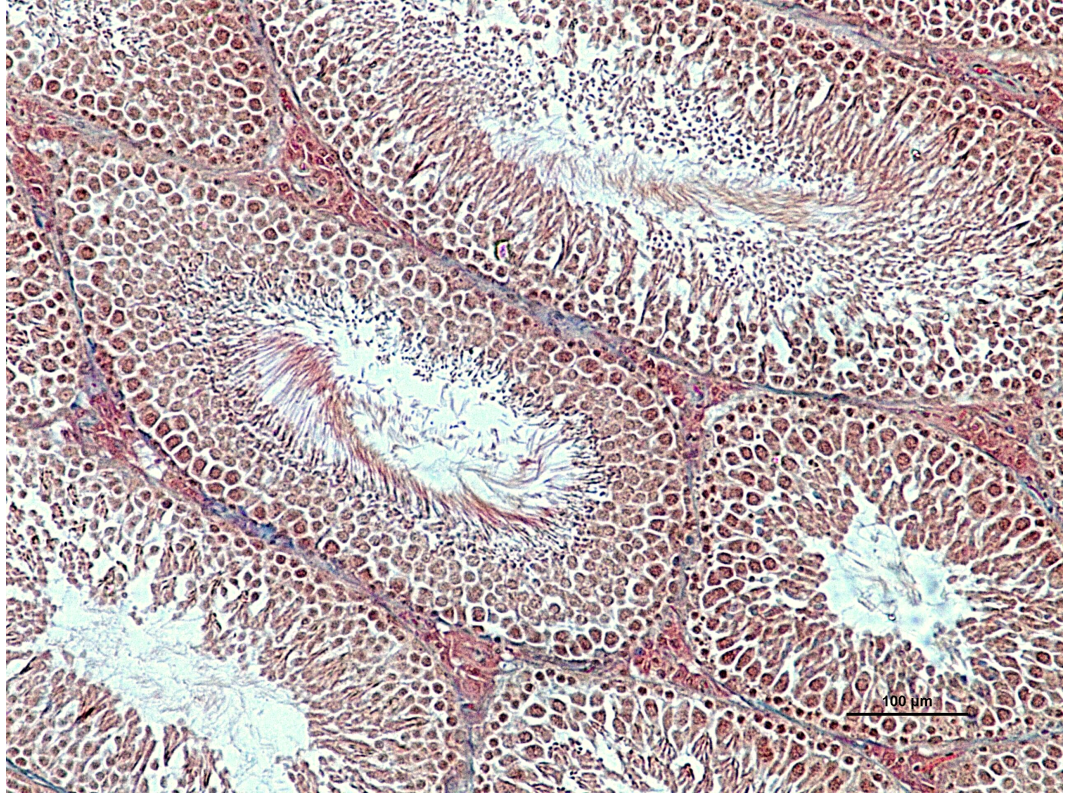
Şekil 4.11. Seminifer tübül lümeninde hücre döküntüsü (*), Diyabet grubu, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 20x



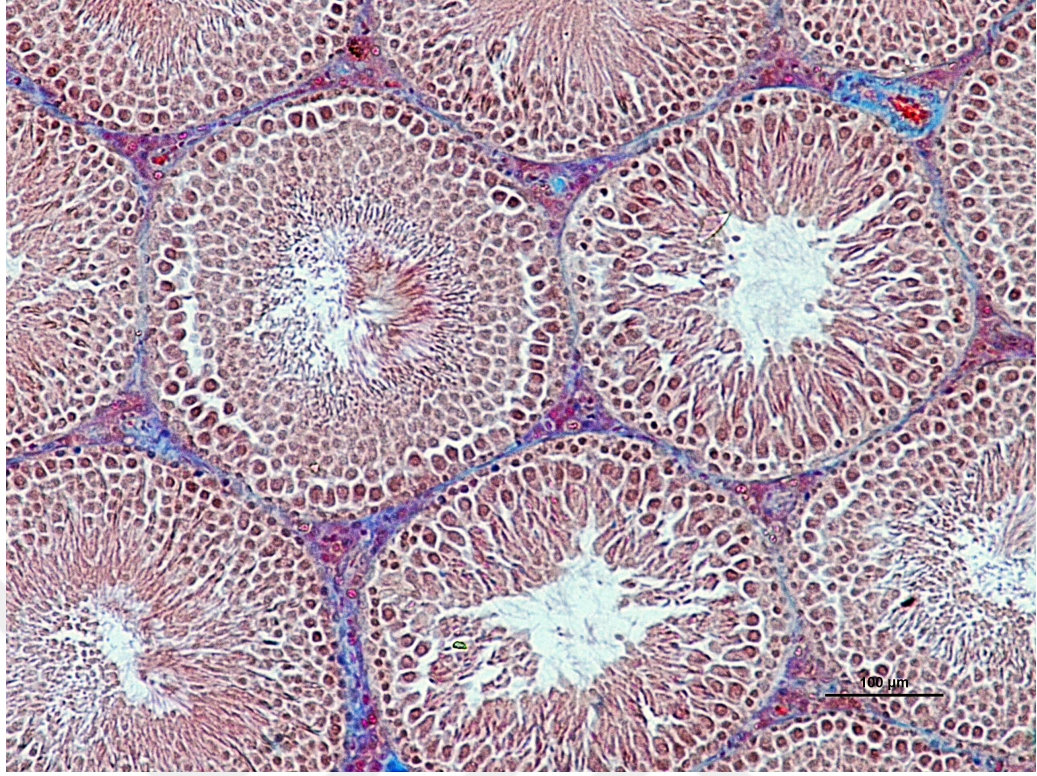
Şekil 4.12. Tedavi grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



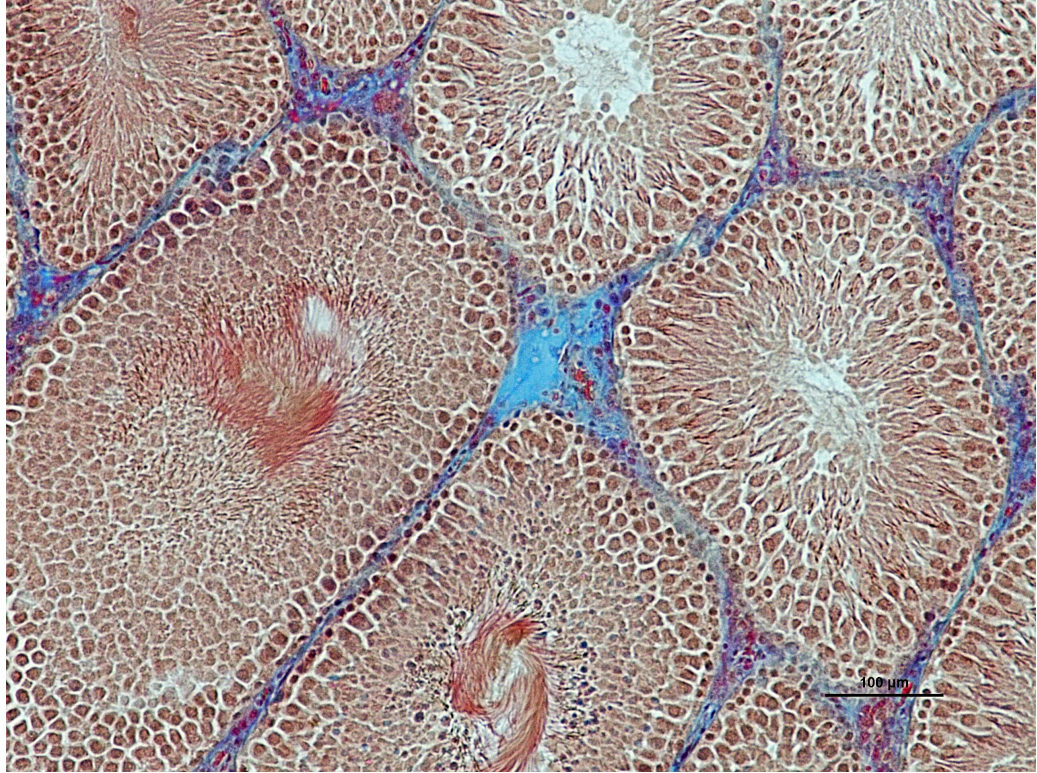
Şekil 4.13. Tedavi grubuna ait testis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



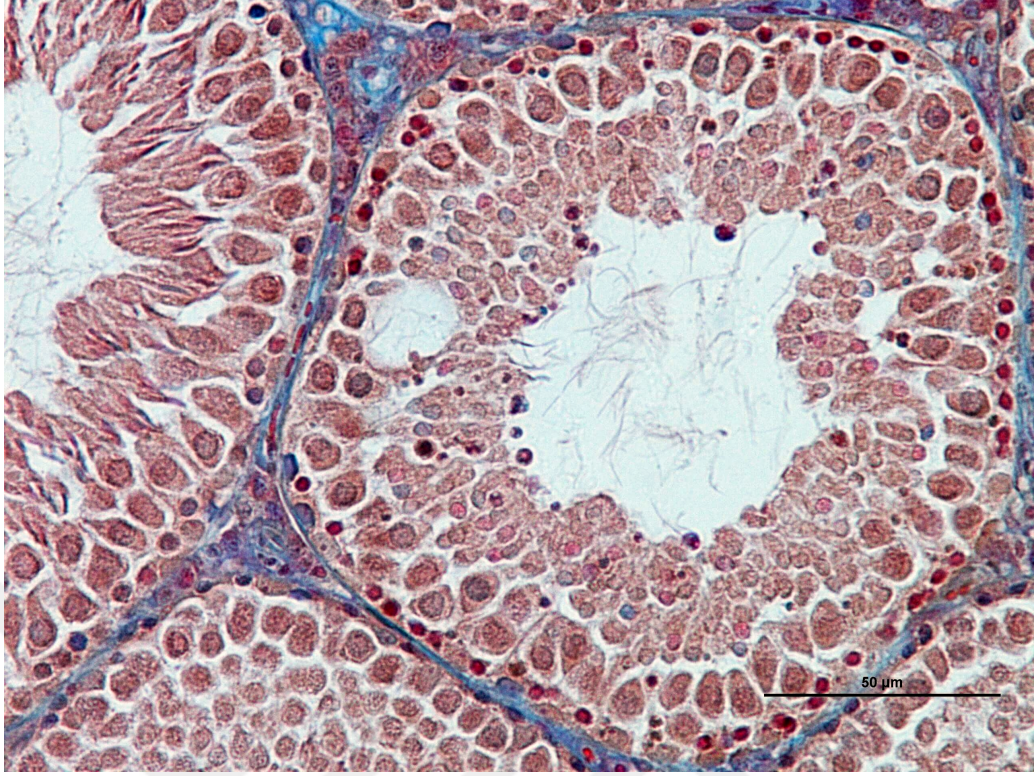
Şekil 4.14. Sham kontrol grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması, 10x



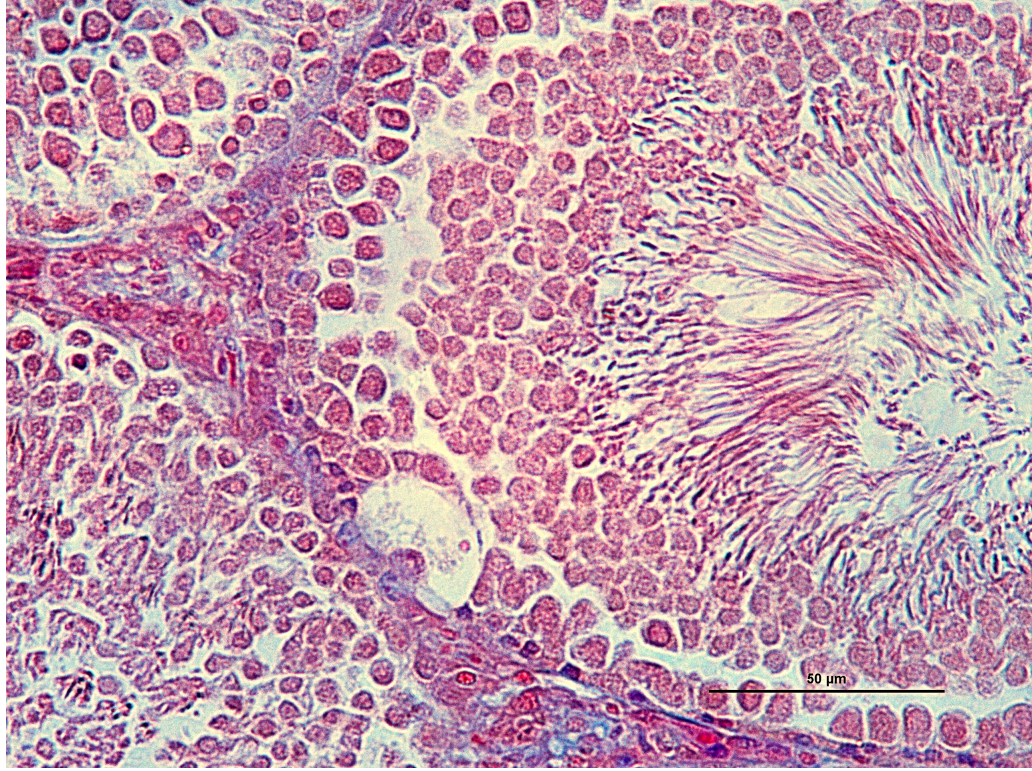
Şekil 4.15. İntertübüler bağ dokusunda artış, Diyabet grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması, 10x



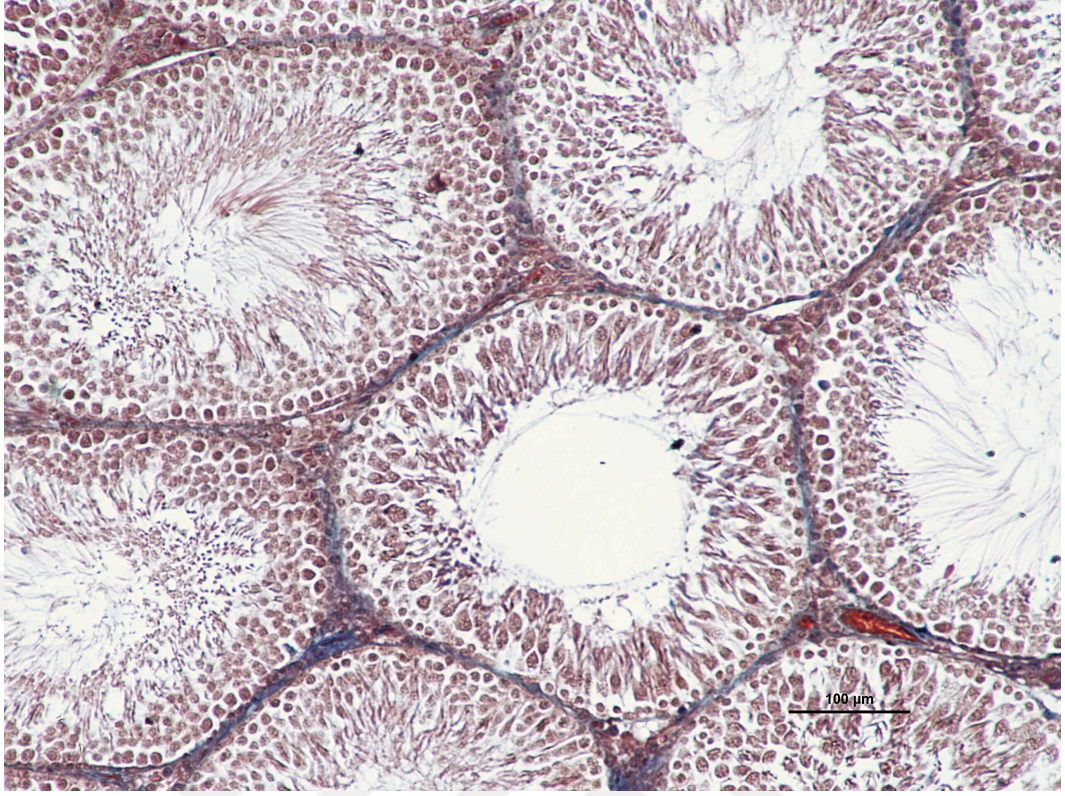
Şekil 4.16. İntertübüler bağ dokusunda artış (→) Diyabet grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması, 10x



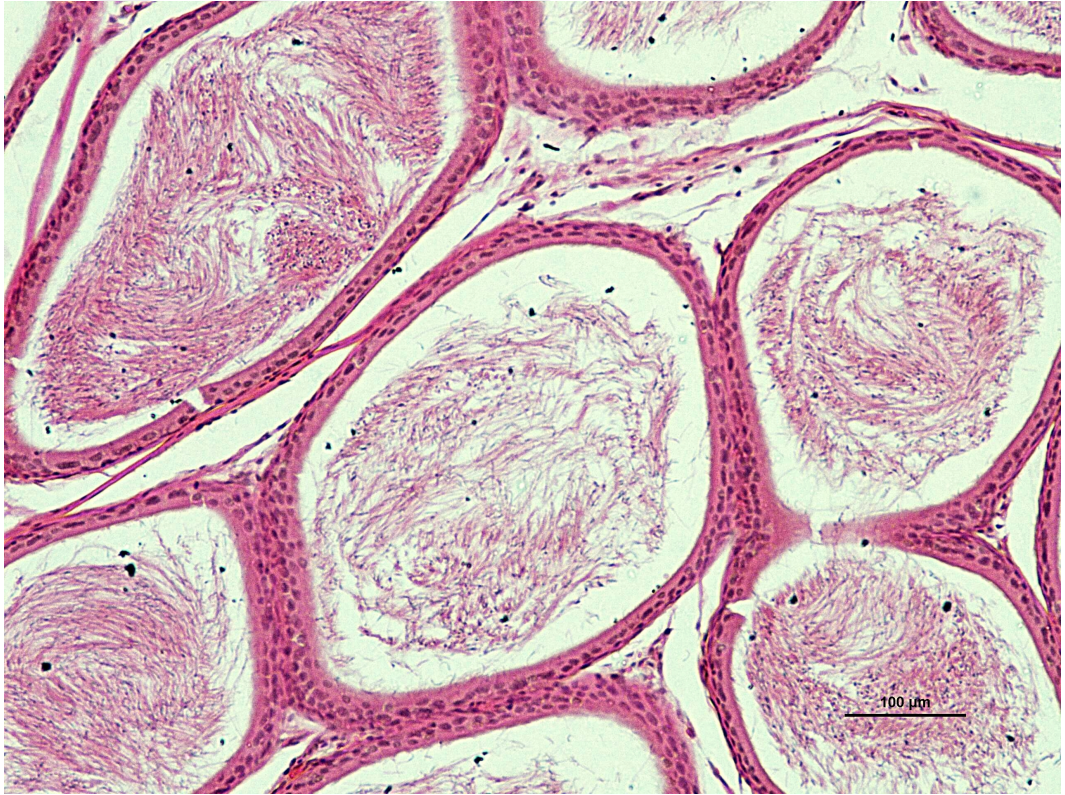
Şekil 4.17. Seminifer tübül içinde vakuol oluşumu (→) Diyabet grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması, 20x



Şekil 4.18. Seminifer tübül içinde vakuol oluşumu (→) Diyabet grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması, 20x



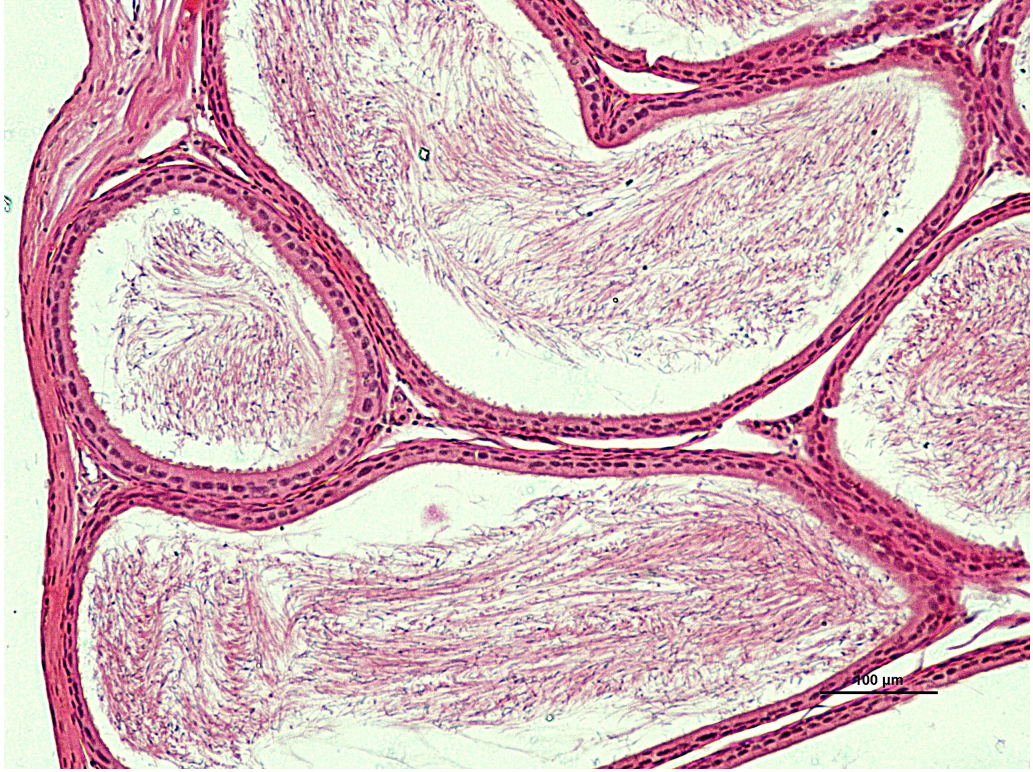
Şekil 4.19. Tedavi grubuna ait testis, Masson Üçlü Boyaması, 10x



Şekil 4.20. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



Şekil 4.21. Diyabet grubuna ait epididimis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x



Şekil 4.22. Tedavi grubuna ait epididimis, Hematoksilen-Eozin Boyaması, 10x

4.2.2. Spermiyogram bulguları

Sakrifikasyondan hemen sonra sperm sayımları yapılan grupların toplam sperm sayıları ve hareketli sperm sayıları Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Grupların toplam sperm sayıları

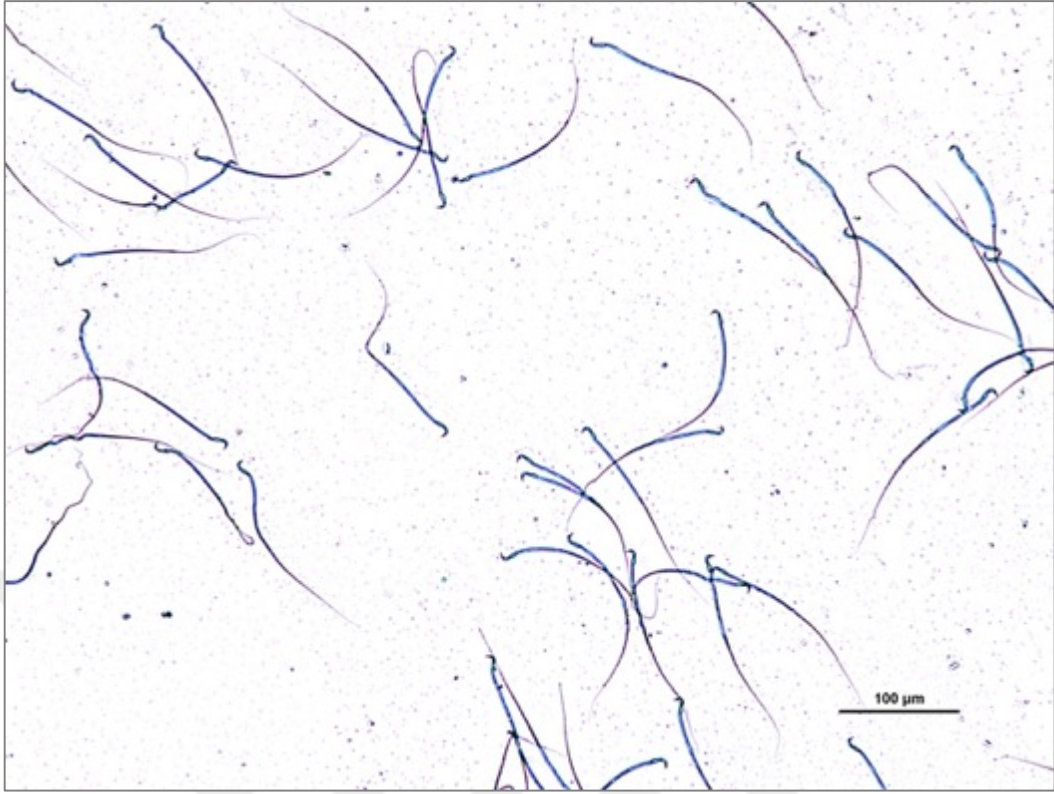
Gruplar	Sham kontrol ($\pm$SD)	LBP kontrol ($\pm$SD)	Diyabet ($\pm$SD)	Tedavi ($\pm$SD)
Toplam sperm sayısı ($\times 10^5$)	106,5 $\pm$ 26,65	165,5 $\pm$ 67,21	111,89 $\pm$ 50,29	191 $\pm$ 103,54

Tablo 4.4. Grupların hareketli sperm sayıları

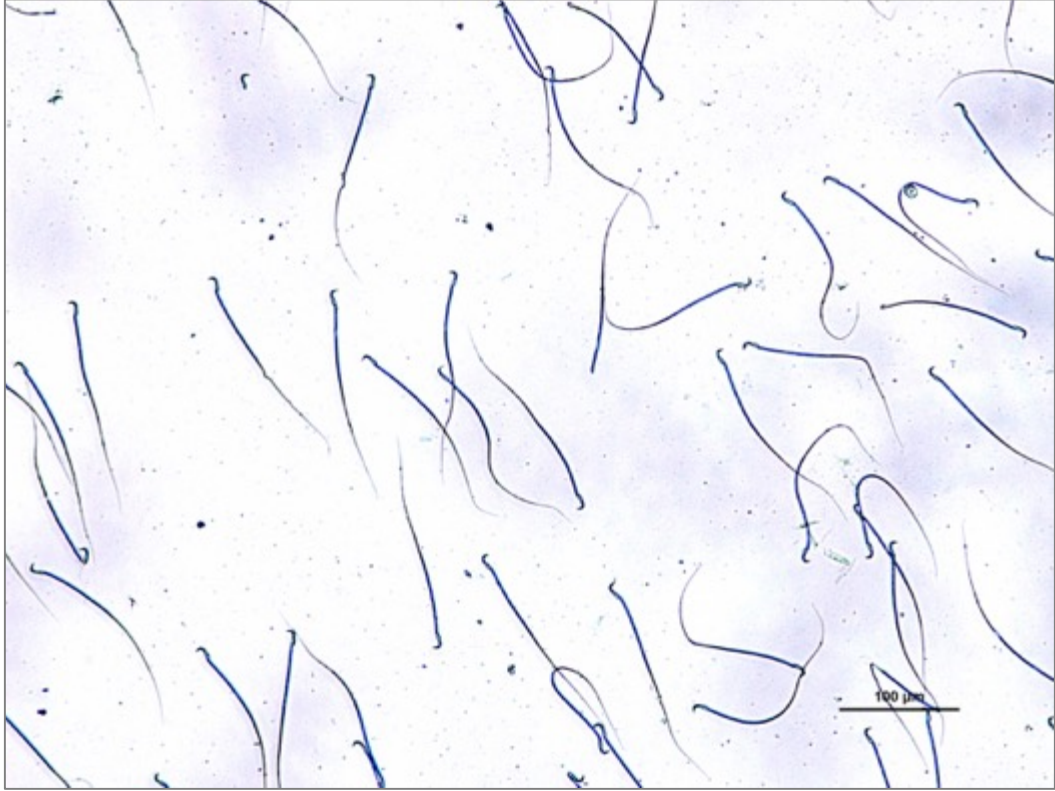
Gruplar	Sham kontrol ($\pm$SD)	LBP kontrol ($\pm$SD)	Diyabet ($\pm$SD)	Tedavi ($\pm$SD)
Hareketli sperm sayısı ($\times 10^5$)	18,17 $\pm$ 9,15	15,33 $\pm$ 19,13	0 $\pm$ 0	28,20 $\pm$ 20,14

Toplam sperm sayısı için sadece diyabet ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0.000$, $p\leq 0.05$). Diyabet grubunda toplam sperm sayısının tedavi grubuna kıyasla daha az olması, diyabetin sperm sayısında azalmaya sebep olduğunu gösterdi. Hareketli sperm sayısı için tüm gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.003$, $p\leq 0.05$). Diyabet grubunun hareketli sperm sayısı sham kontrol ve LBP kontrol gruplarına kıyasla daha azdı. İstatistiksel olarak da diyabet ve sham kontrol grubu arasında $p=0.004$, $p\leq 0.05$ anlamlılık düzeyinde, diyabet ve LBP kontrol grubu arasında da $p=0.002$, $p\leq 0.05$ anlamlılık düzeyinde fark tespit edildi. Tedavi grubundaki hareketli sperm sayısının diyabet grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p=0.000$, $p\leq 0.05$).

Spermilerin morfolojisi açısından gruplar arasında herhangi bir fark görülmedi. Ayrıca sperm DNA bütünlüğünü belirlemek için yapılan Anilin mavisi boyamasında gruplar arasında herhangi bir fark tespit edilmedi.



Şekil 4.23. Sham kontrol grubuna ait sperm yayma, Anilin Mavisi Boyaması, 10x



Şekil 4.24. Diyabet grubuna ait sperm yayma, Anilin Mavisi Boyaması, 10x

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

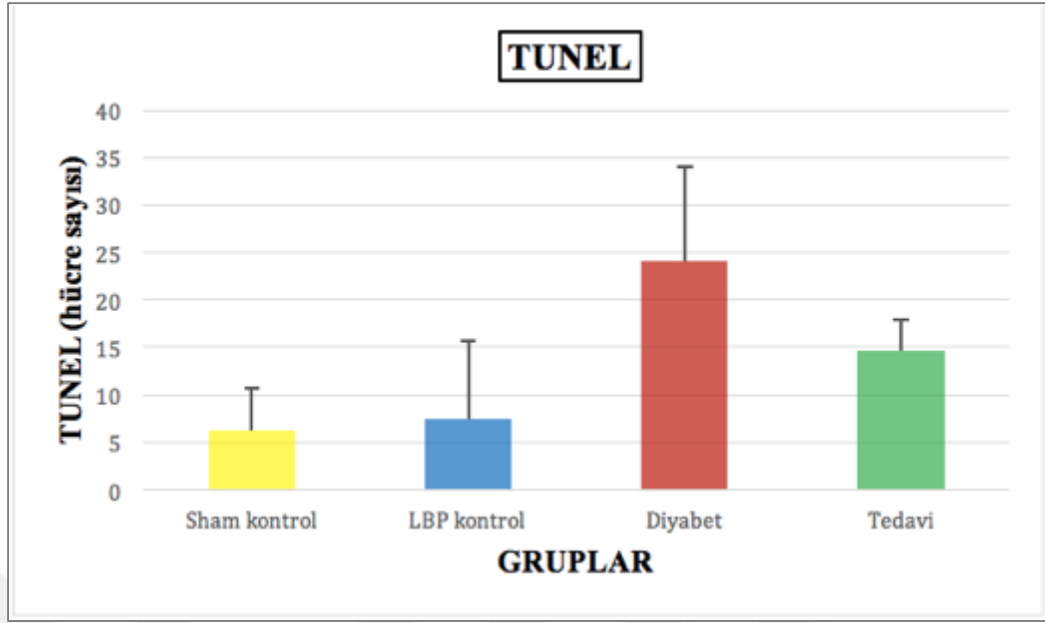
4.2.1. TUNEL immün işaretleme

Apoptotik hücreleri belirlemek için TUNEL yöntemi uygulandı. Kırılan DNA parçalarının 3'-OH uçları terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak digoksinin işaretli dUTP ile in situ olarak işaretlendi. TUNEL boyama uygulanan testis dokularında; sham kontrol, LBP kontrol, diyabet ve tedavi gruplarında apoptotik hücreler gözlemlendi. Her deneğe ait doku kesitinde mikroskopta beş farklı alanda 20x ile apoptotik hücre sayımı yapıldı. Grupların TUNEL pozitif hücre sayıları Tablo 4.5.'te ve Grafik 4.2.'de gösterilmiştir. Apoptotik hücre sayılarında bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0.000$, $p\leq 0.05$) Sham kontrol grubuyla diyabet grubu arasında beklendiği gibi istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0.001$, $p\leq 0.05$). Diyabet ve tedavi grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0.024$, $p\leq 0.05$).

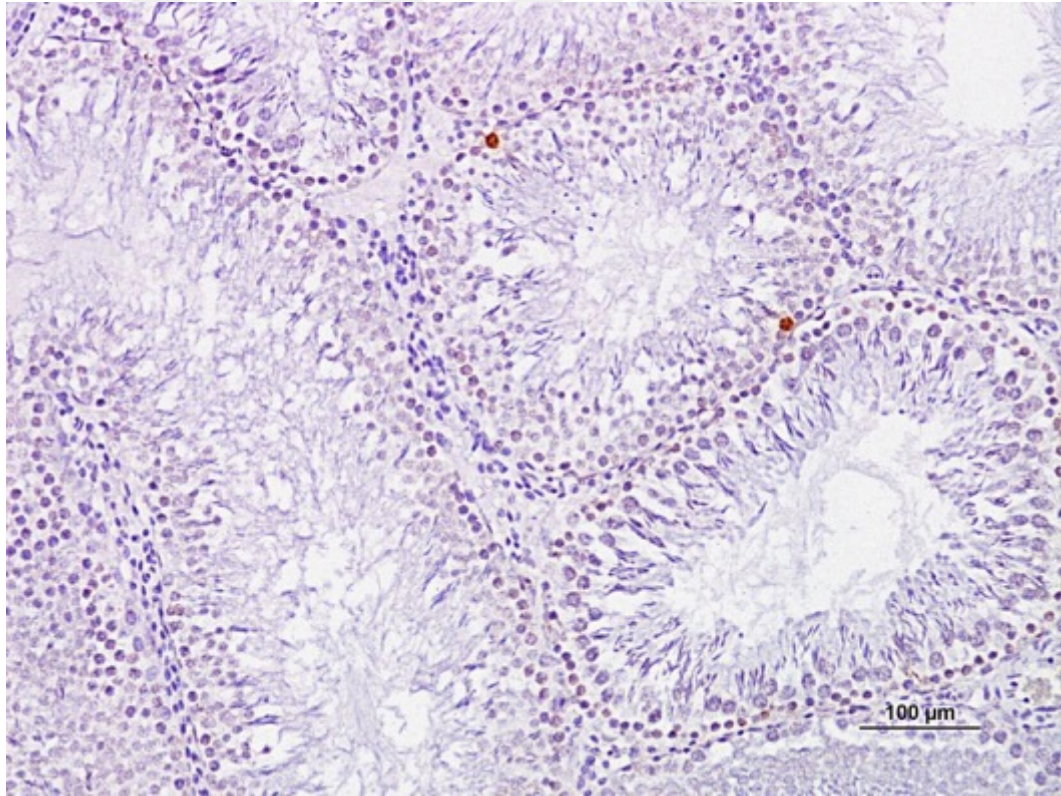
Diyabet grubunda TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısındaki anlamlı artış, diyabetin spermatogenik hücreleri hasarlayarak apoptozise yol açtığını gösterdi. Ayrıca tedavi grubunda TUNEL pozitif hücre sayısında anlamlı bir düşüşün olması beklendiği gibi spermatogenik hücre hasarının ve apoptozisin diyabet grubuna kıyasla daha az olduğunu gösterdi.

Tablo 4.5. Grupların TUNEL pozitif hücre sayıları

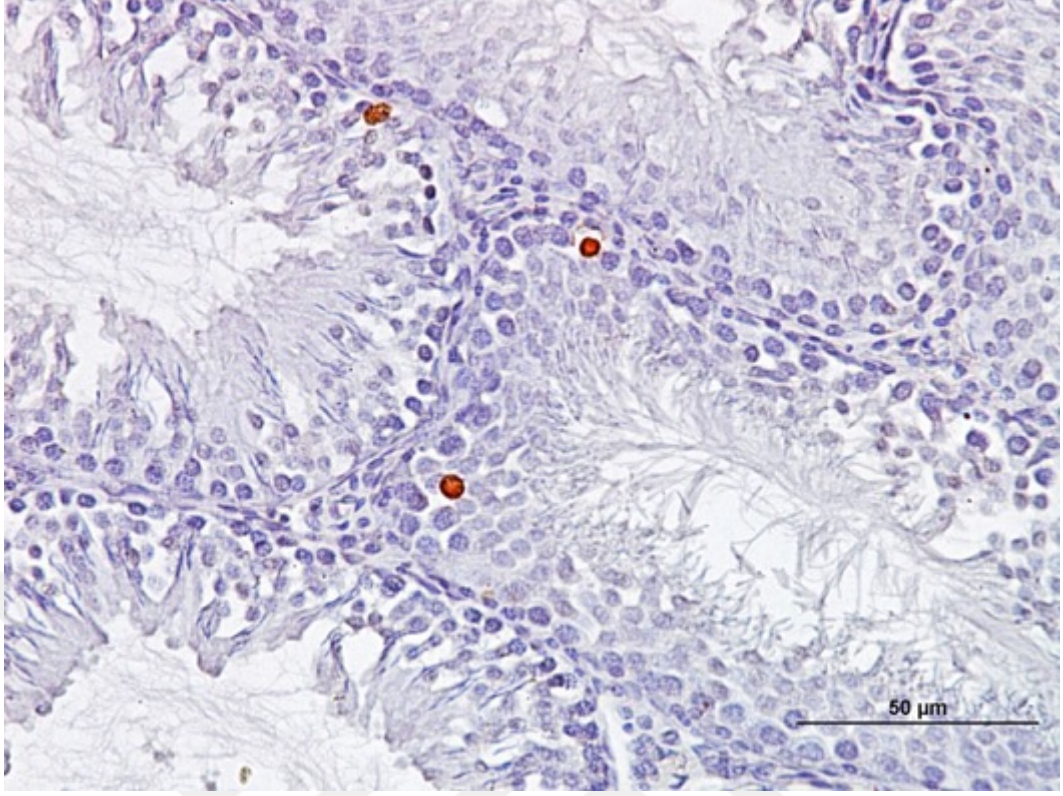
Gruplar	Sham kontrol ($\pm$ SD)	LBP kontrol ($\pm$ SD)	Diyabet ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
TUNEL (hücre sayısı)	6,17 $\pm$ 4,579	7,50 $\pm$ 8,167	24,11 $\pm$ 9,981	14,70 $\pm$ 3,129



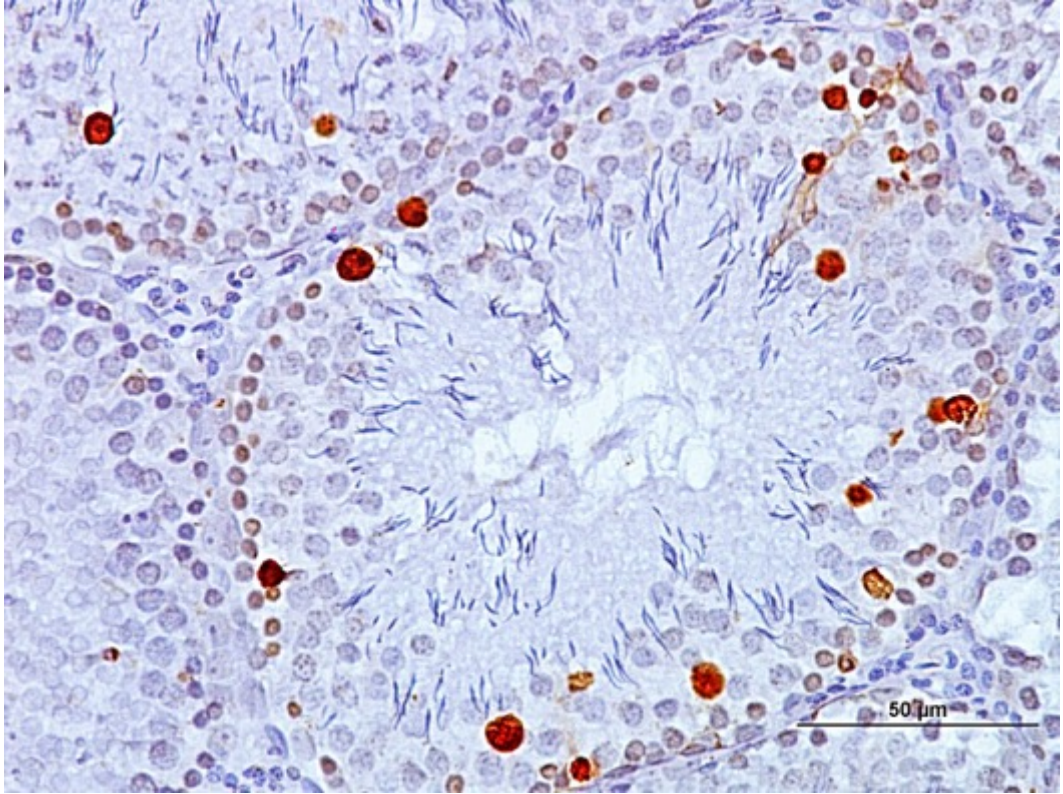
Grafik 4.2. Grupların TUNEL pozitif hücre sayısı grafiği



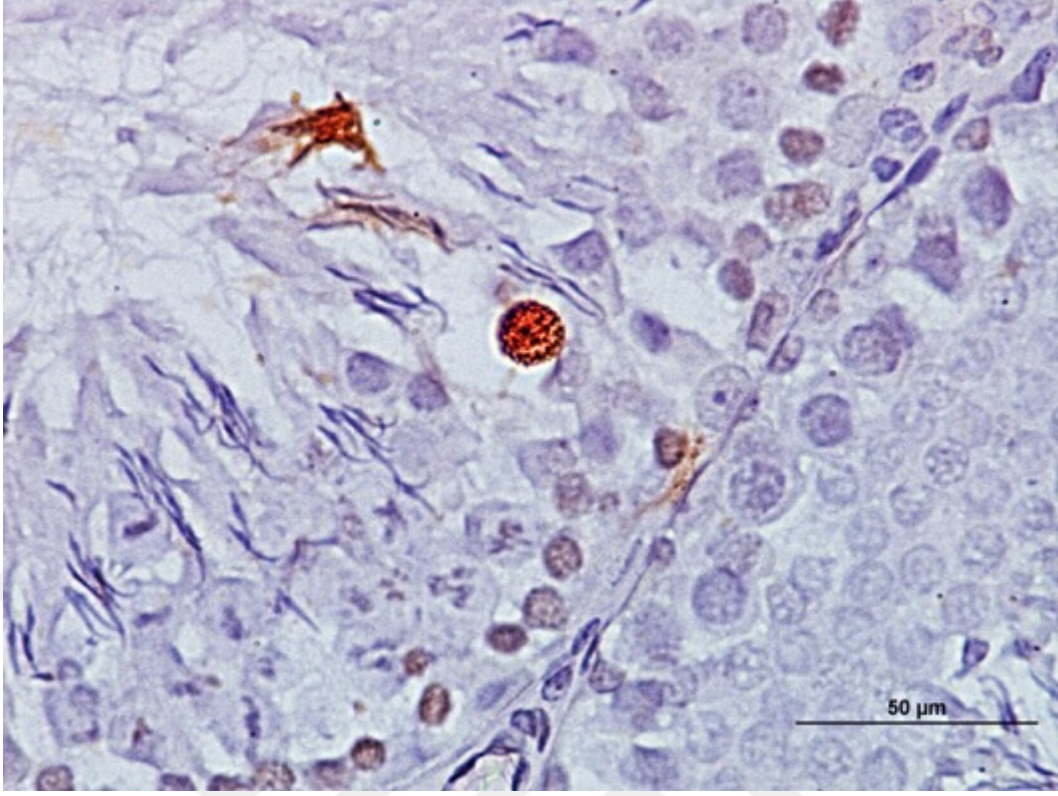
Şekil 4.25. Sham kontrol grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 10x



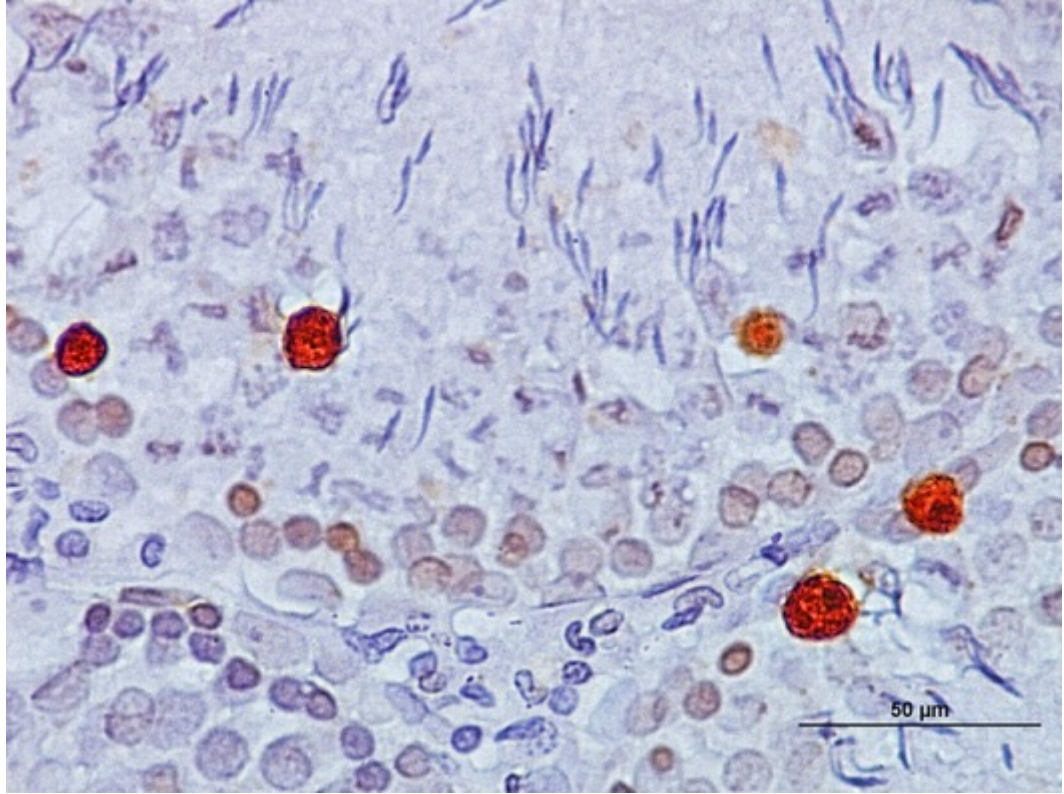
Şekil 4.26. LBP kontrol grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 20x



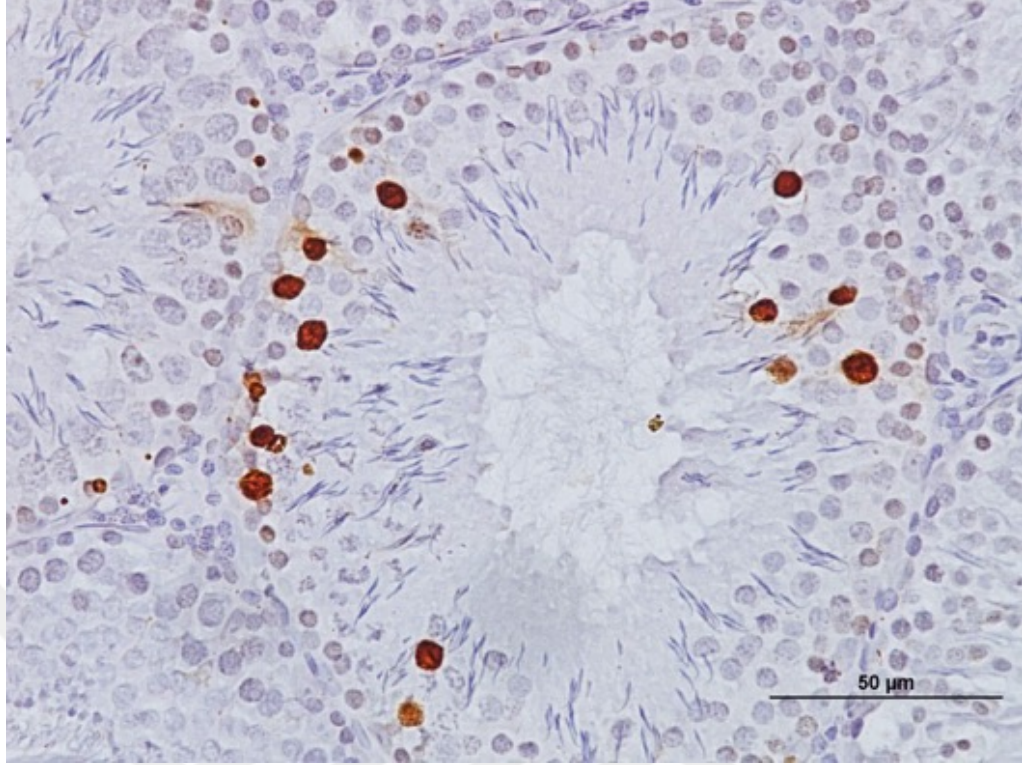
Şekil 4.27. Diyabet grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 20x



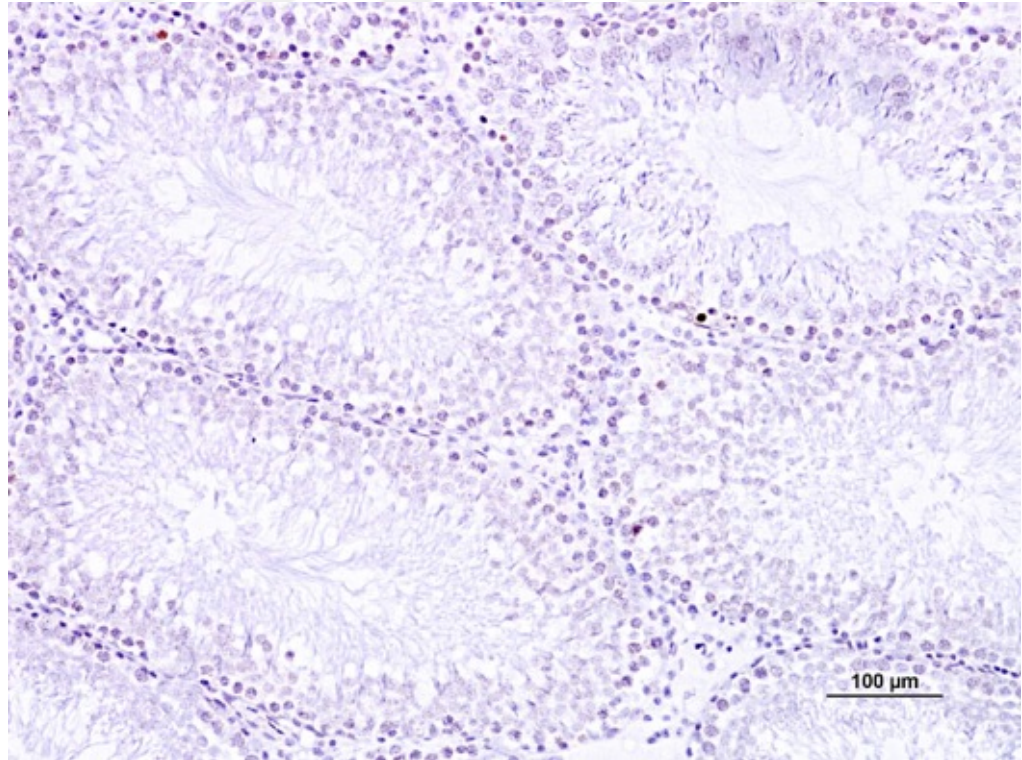
Şekil 4.28. Diyabet grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 40x



Şekil 4.29. Diyabet grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 40x



Şekil 4.30. Diyabet grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 20x



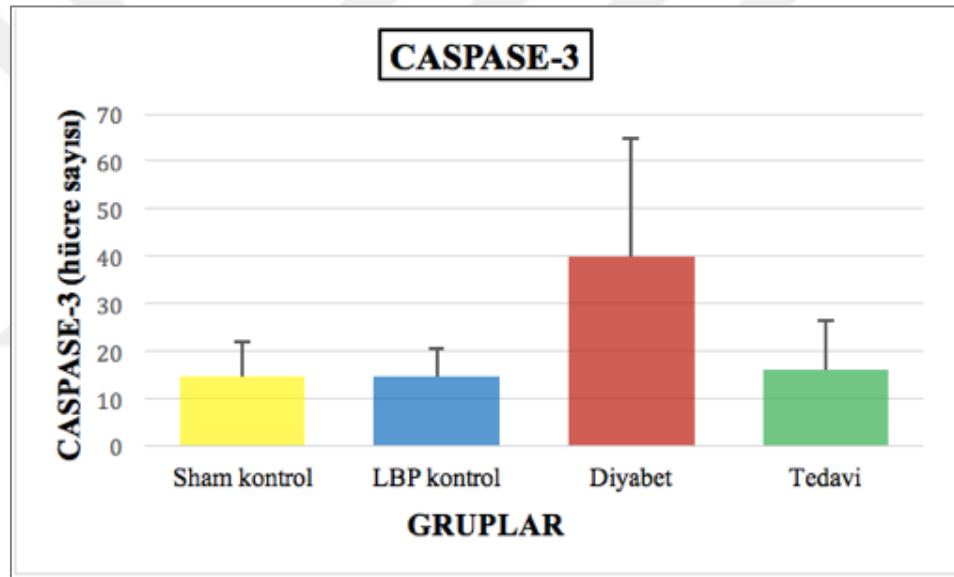
Şekil 4.31. Tedavi grubuna ait testis, TUNEL immün işaretleme, 10x

4.2.2. Caspase-3 immün işaretleme

Apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla Caspase-3 immün işaretleme yapılan testis dokularında apoptotik hücreler koyu kahverengi gözlenerek, her grup için pozitif hücre sayımı yapıldı (Tablo 4.6. ve Grafik 4.3.'te gösterilmiştir).

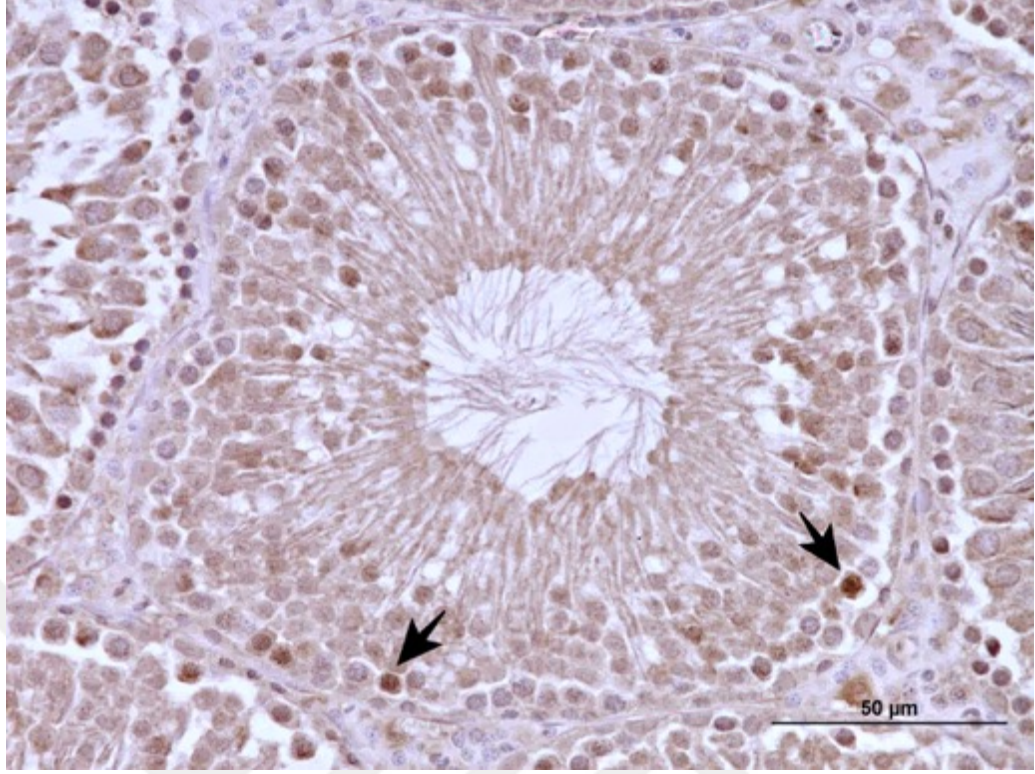
Tablo 4.6. Grupların Caspase-3 pozitif hücre sayıları

Gruplar	Sham kontrol ($\pm$ SD)	LBP kontrol ($\pm$ SD)	Diyabet ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Caspase-3 (hücre sayısı)	14,67 $\pm$ 7,28	14,50 $\pm$ 6,19	40 $\pm$ 24,79	16 $\pm$ 10,43

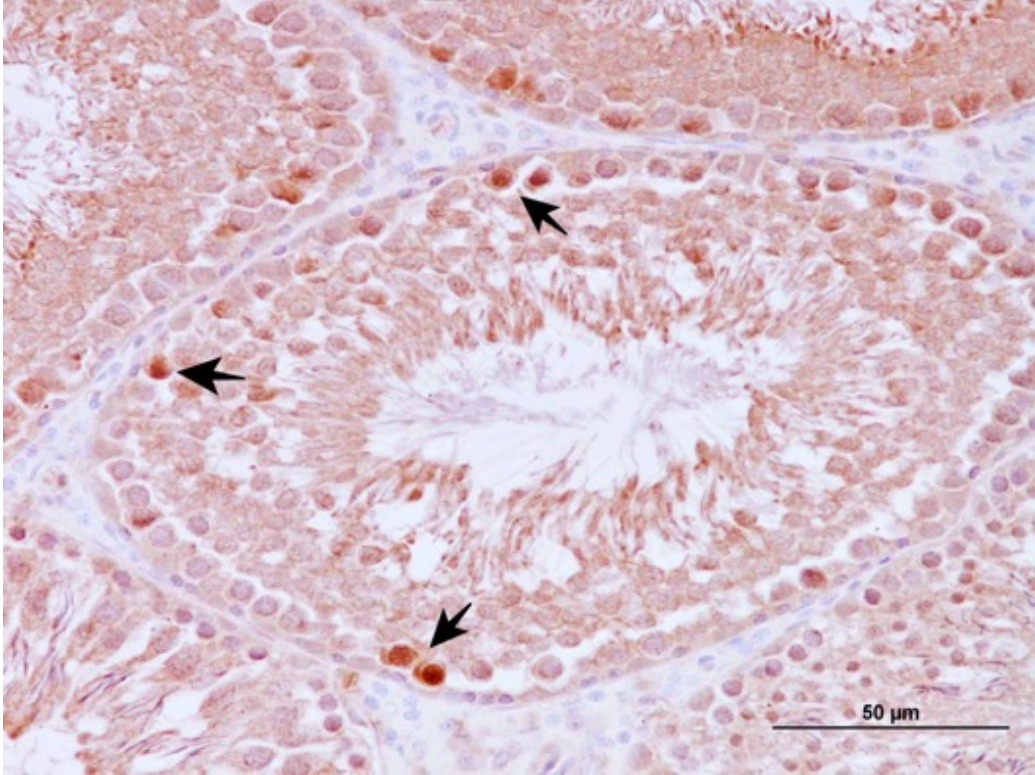


Grafik 4.3. Grupların Caspase-3 pozitif hücre sayısı grafiği

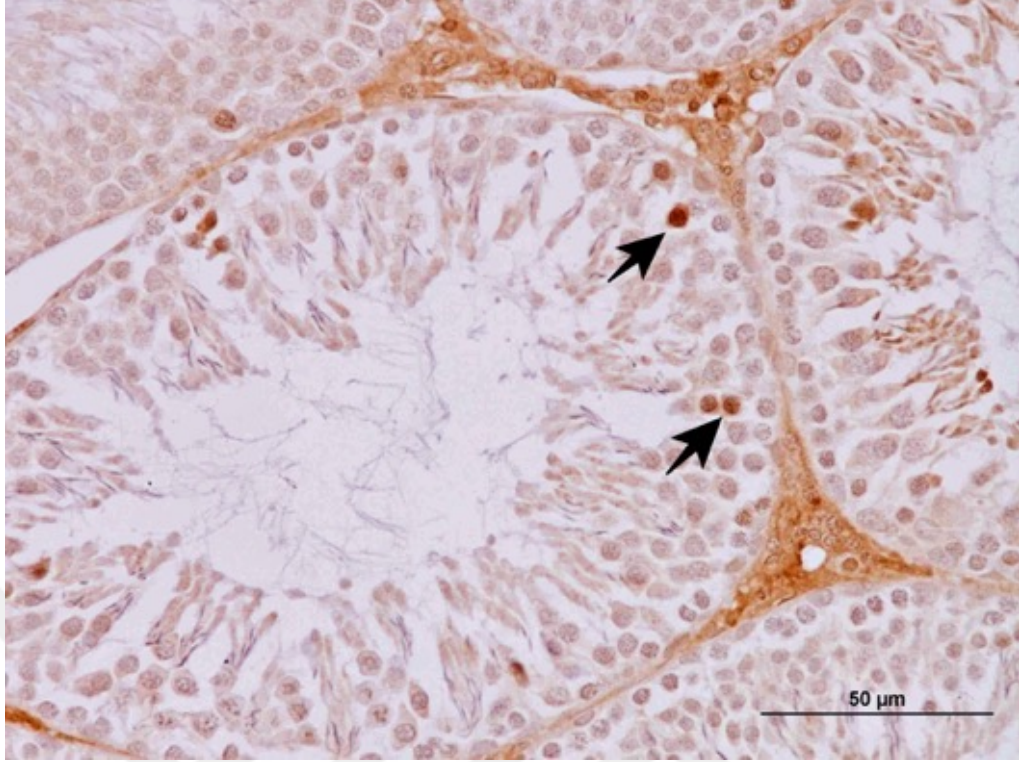
Caspase-3 pozitif hücre sayımı yapılan gruplar için, sham kontrol ile LBP kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p=0.937$, $p>0.05$). Sham kontrol ve diyabet grubu arasında anlamlı fark tespit edildi ($p=0.026$, $p\leq 0.05$). Diyabet grubunda caspase-3 pozitif hücre sayısındaki artış, diyabetin testis dokusunda caspase-3 aktivasyonunu artırarak apoptozisi indüklediği gösterdi. Tedavi grubundaki pozitif hücre sayısı diyabet grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalma gösterdi ($p=0.013$, $p\leq 0.05$). Tedavi grubundaki bu azalma, LBP'nin testis dokusunda caspase-3 aktivasyonunu azalttığını gösterdi. Ayrıca sham kontrol grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0.958$, $p>0.05$).



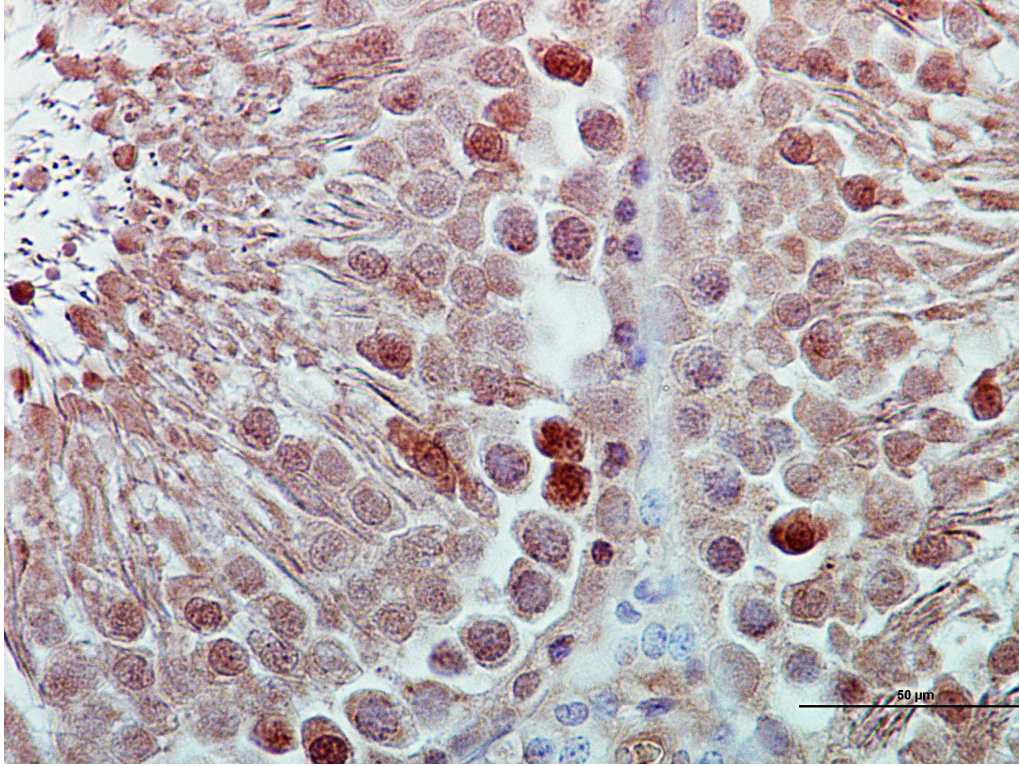
Şekil 4.32. Sham kontrol grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 20x



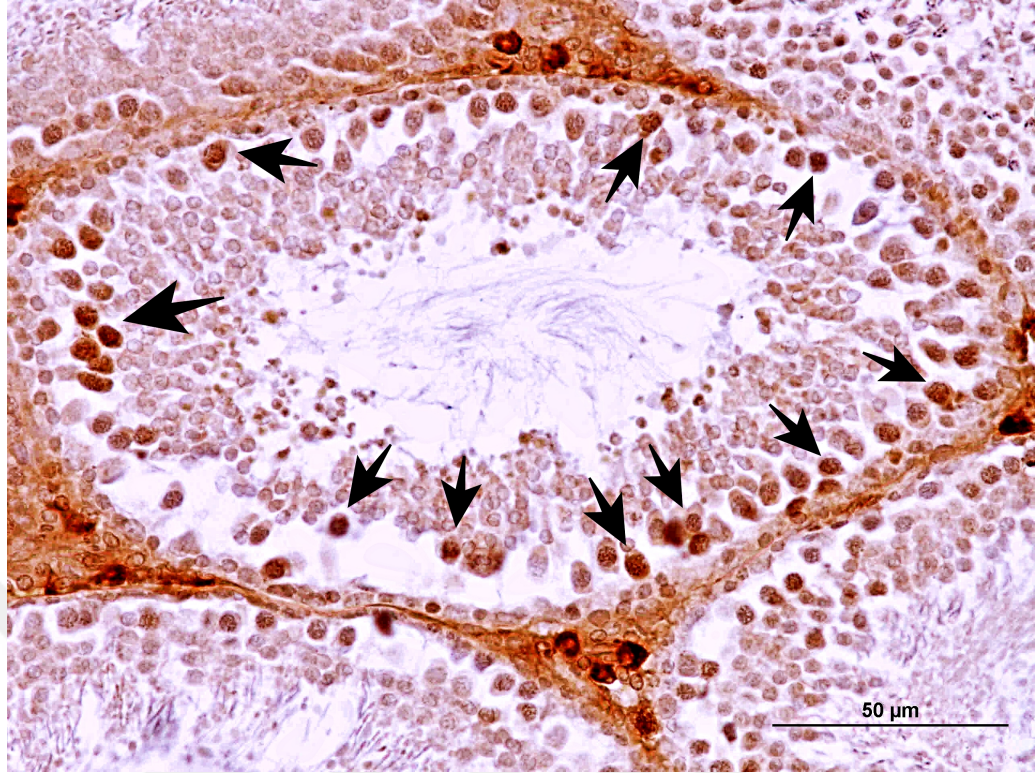
Şekil 4.33. Sham kontrol grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 20x



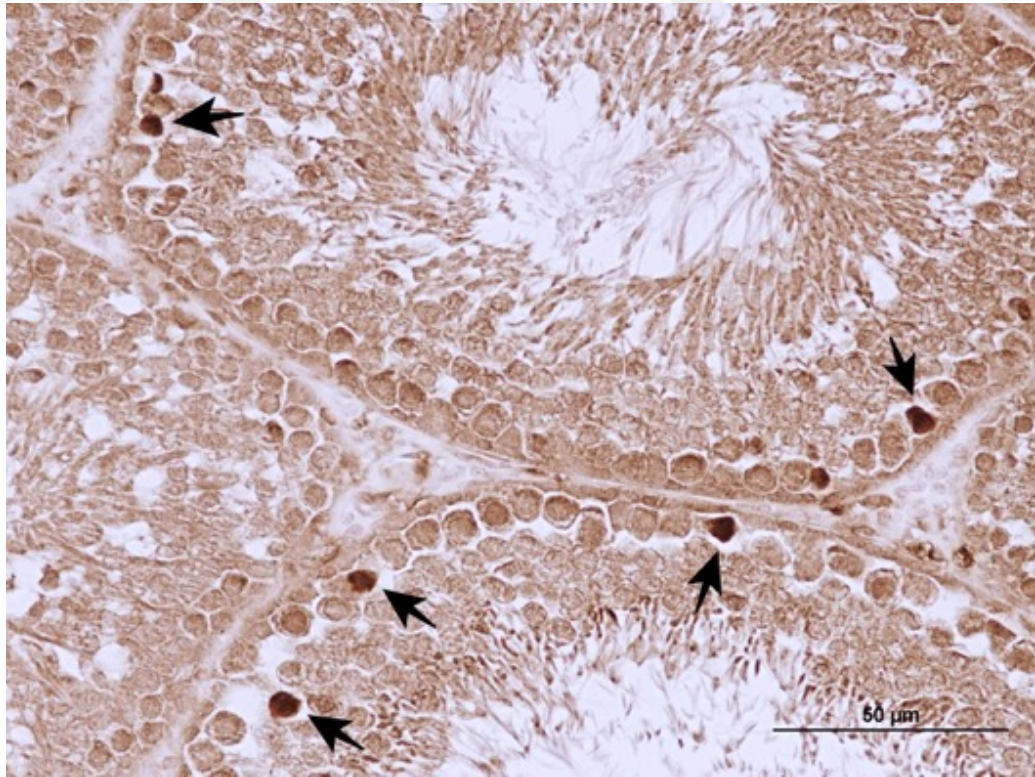
Şekil 4.34. LBP kontrol grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 20x



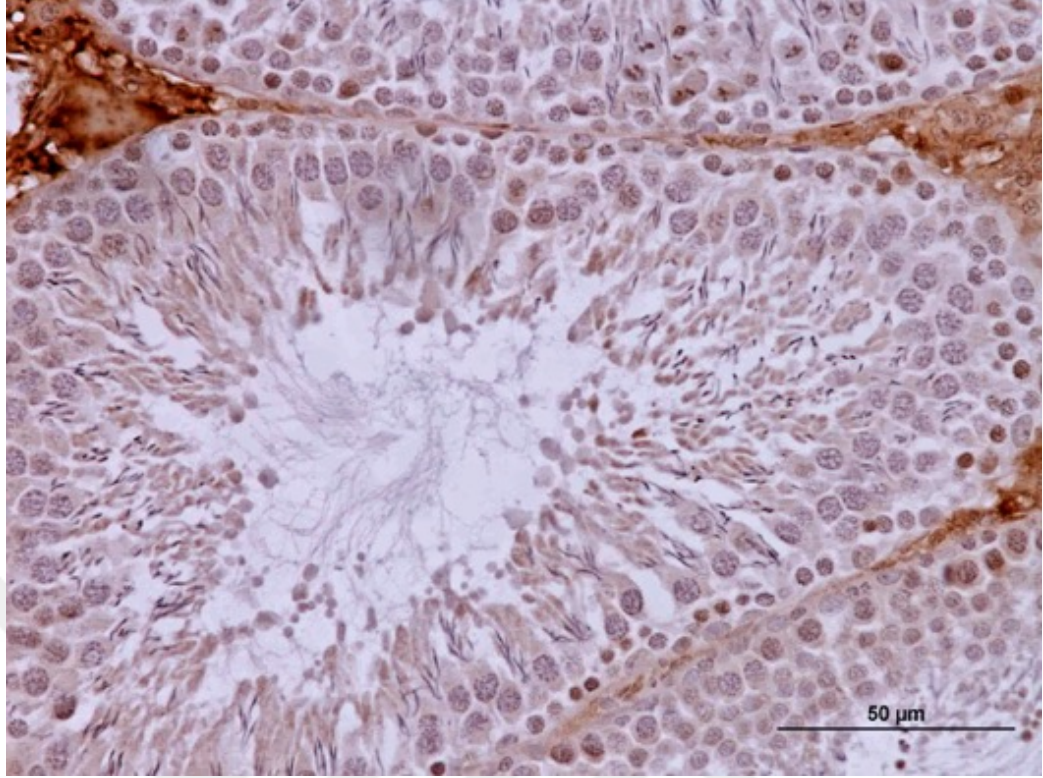
Şekil 4.35. Diyabet grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 40x



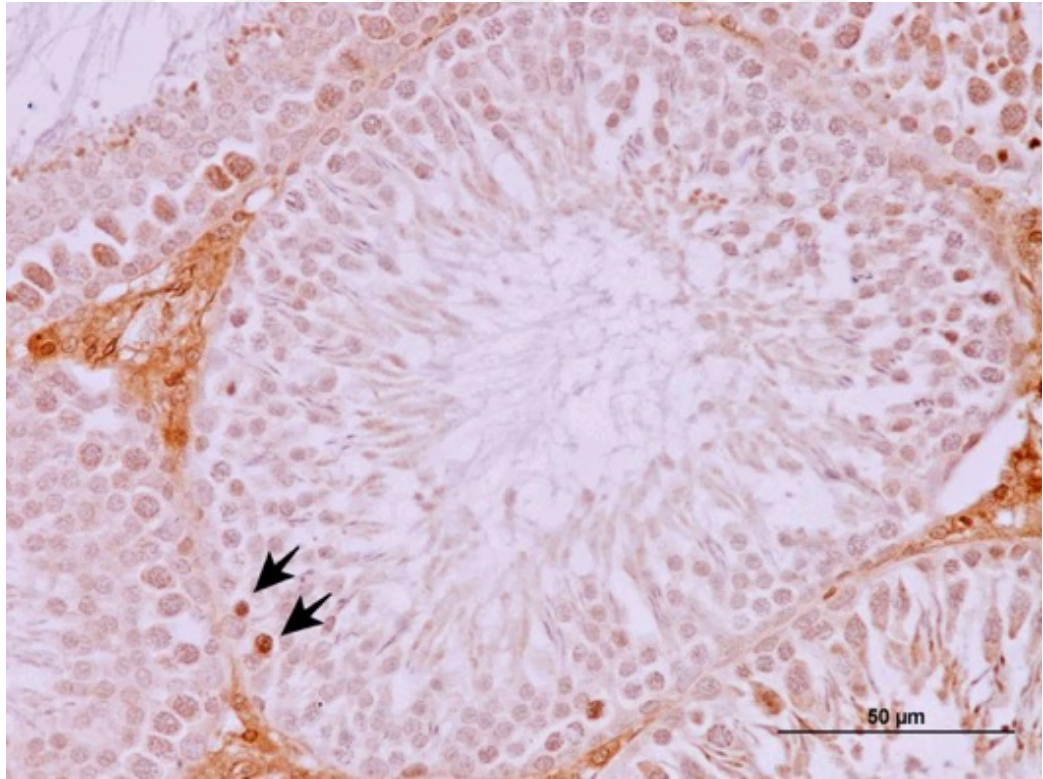
Şekil 4.36. Diyabet grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.37. Diyabet grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.38. Tedavi grubuna ait testis, Caspase-3 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.39. Tedavi grubuna ait testis, Pozitif boyanan hücreler (→) Caspase-3 immün işaretleme, 20x

4.2.3. Crisp-1 immün işaretleme

Epididimis epitelinden Crisp-1 protein ekspresyon düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Crisp-1 immün işaretlemede, bütün gruplarda stereosilyumların çok belirgin boyandığı görüldü. Ayrıca epididimisin epitel hücrelerinde pozitif sitoplazmik boyanma gözlemlendi.

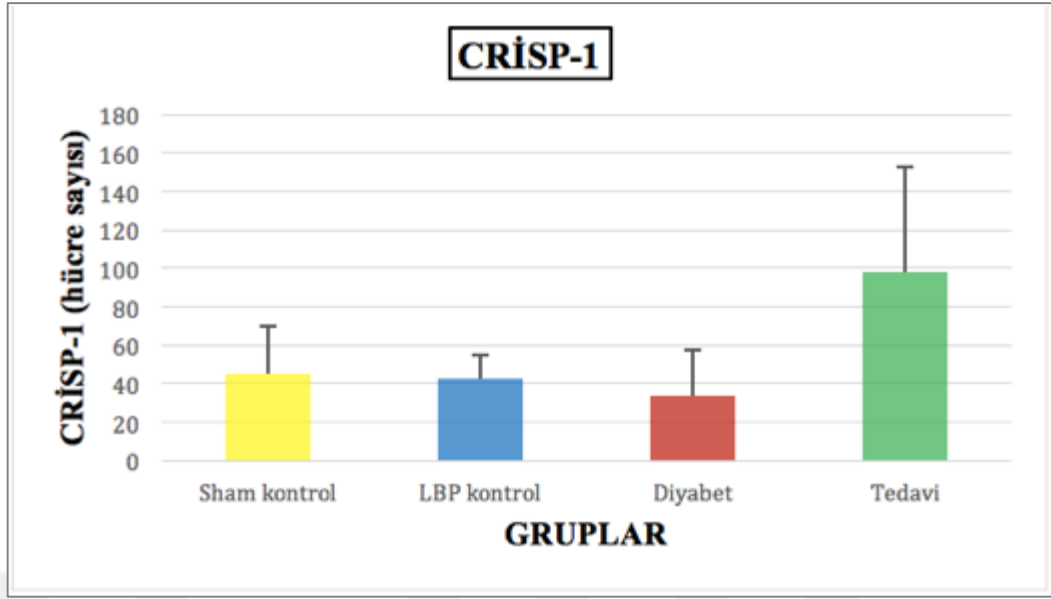
Epididimis tübül lümenlerinin içerisindeki spermilerin de pozitif boyandığı tespit edildi. Ayrıca hem lümen içerisinde hem de epitel hücreleri yüzeyinde lümene doğru çıkıntı yapan ve pozitif boyanan vakuol benzeri salgı yapıları gözlemlendi.

Her grup için Crisp-1 pozitif hücre sayımı yapıldı (Tablo 4.7. ve Grafik 4.4.'te gösterilmiştir). Sham kontrol ve diyabet grubu arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0.346$, $p>0.05$). Diyabet ve tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0.002$, $p\leq 0.05$). Sham kontrol ve tedavi grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0.013$, $p\leq 0.05$).

Diyabet grubuna ait epididimis dokusunda Crisp-1 pozitif hücre sayısında azalma olduğu ancak sham kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. Tedavi grubunda ise Crisp-1 pozitif hücre sayısında hem diyabet hem de sham kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artışın olduğu tespit edildi.

Tablo 4.7. Grupların Crisp-1 pozitif hücre sayıları

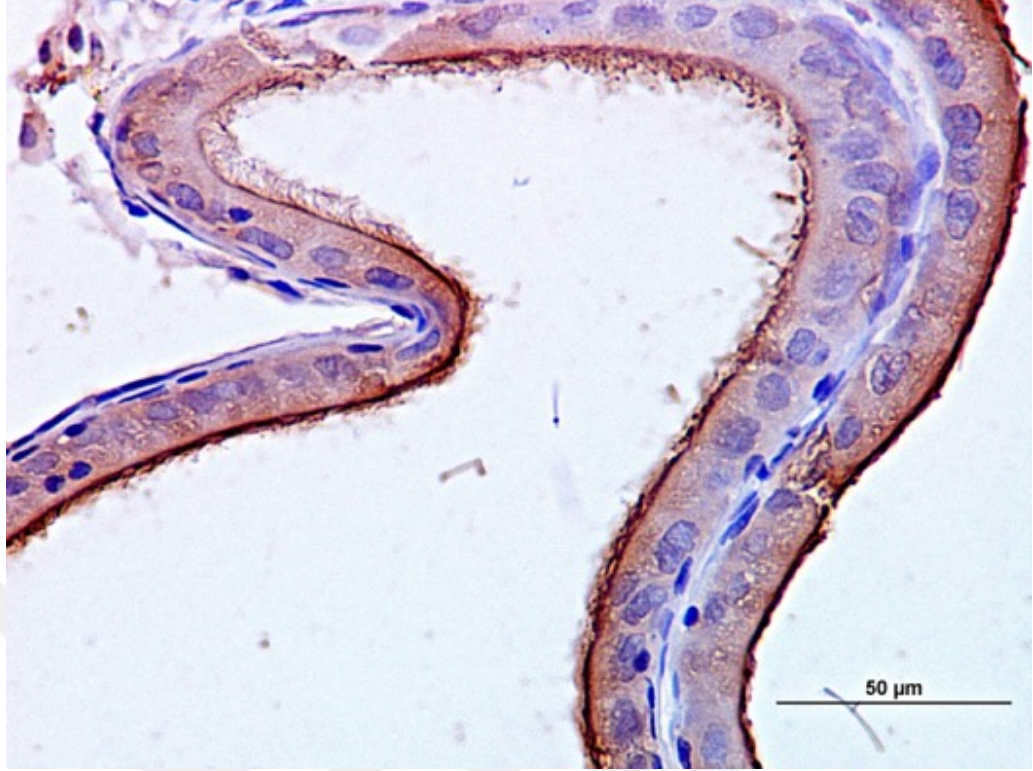
Gruplar	Sham kontrol ($\pm$SD)	LBP kontrol ($\pm$SD)	Diyabet ($\pm$SD)	Tedavi ($\pm$SD)
Crisp-1 (hücre sayısı)	45 $\pm$ 24,66	42,17 $\pm$ 12,45	34 $\pm$ 23,83	98,30 $\pm$ 54,52



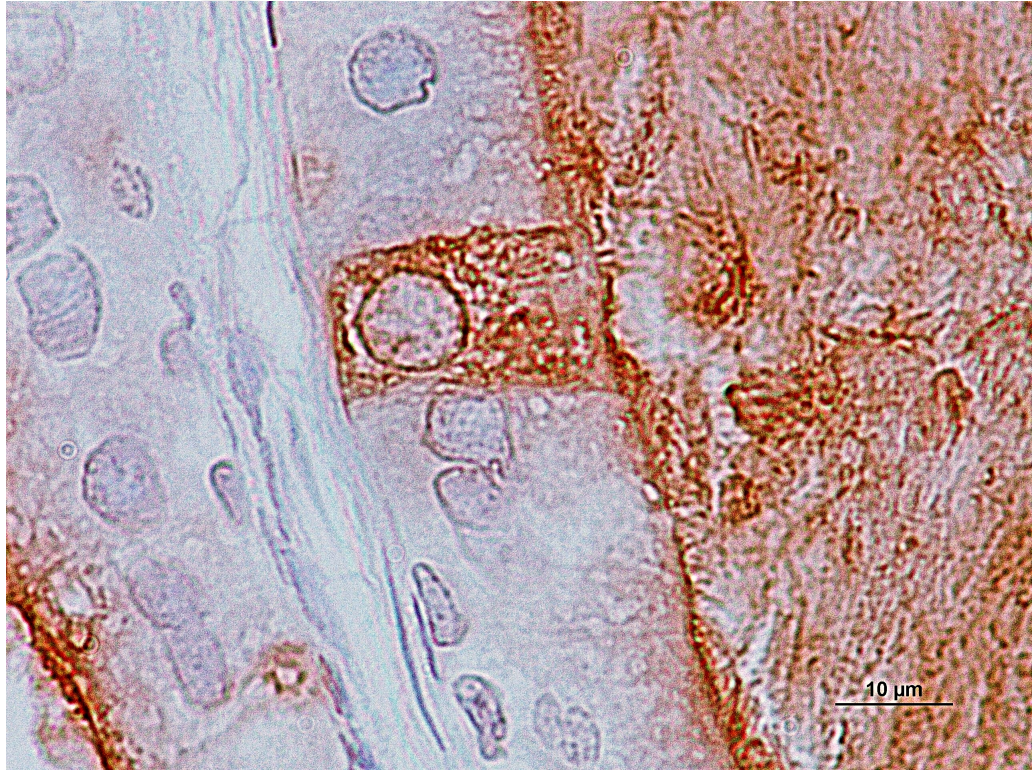
Grafik 4.4. Grupların Crisp-1 ekspresyonu grafiği



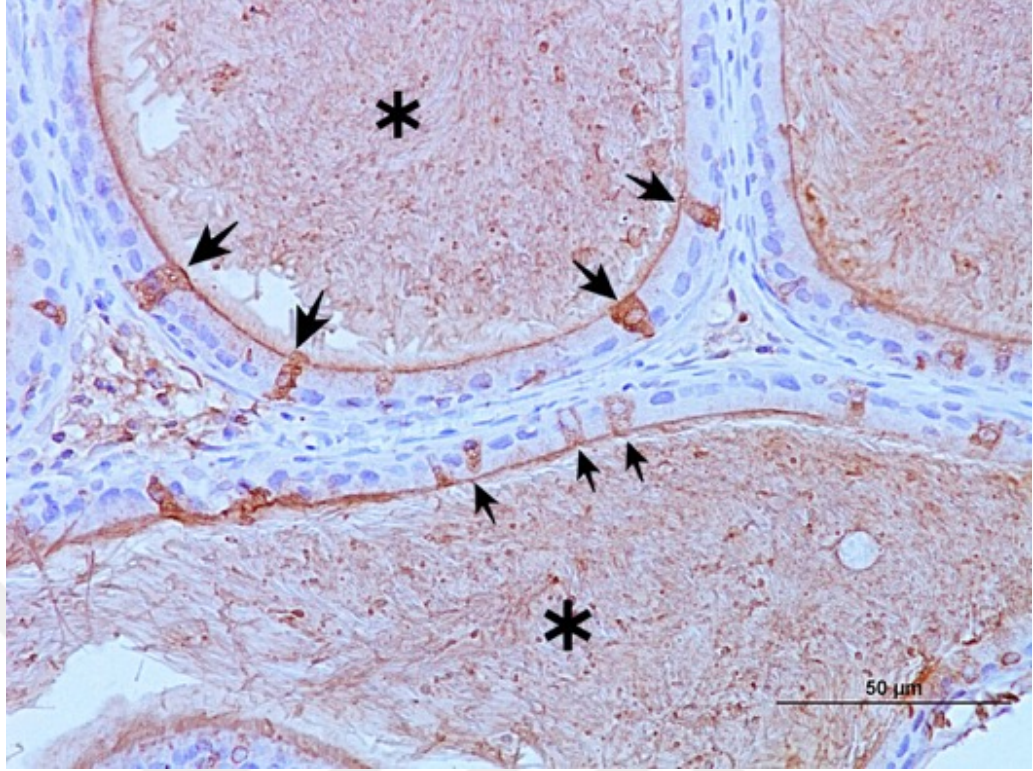
Şekil 4.40. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan stereosilyumlar (*) ve epitel hücreleri (→) Crisp-1 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.41. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Stereosilyumlarda ve epitel hücrelerinde pozitif sitoplazmik boyanma, Crisp-1 immün işaretleme, 20x



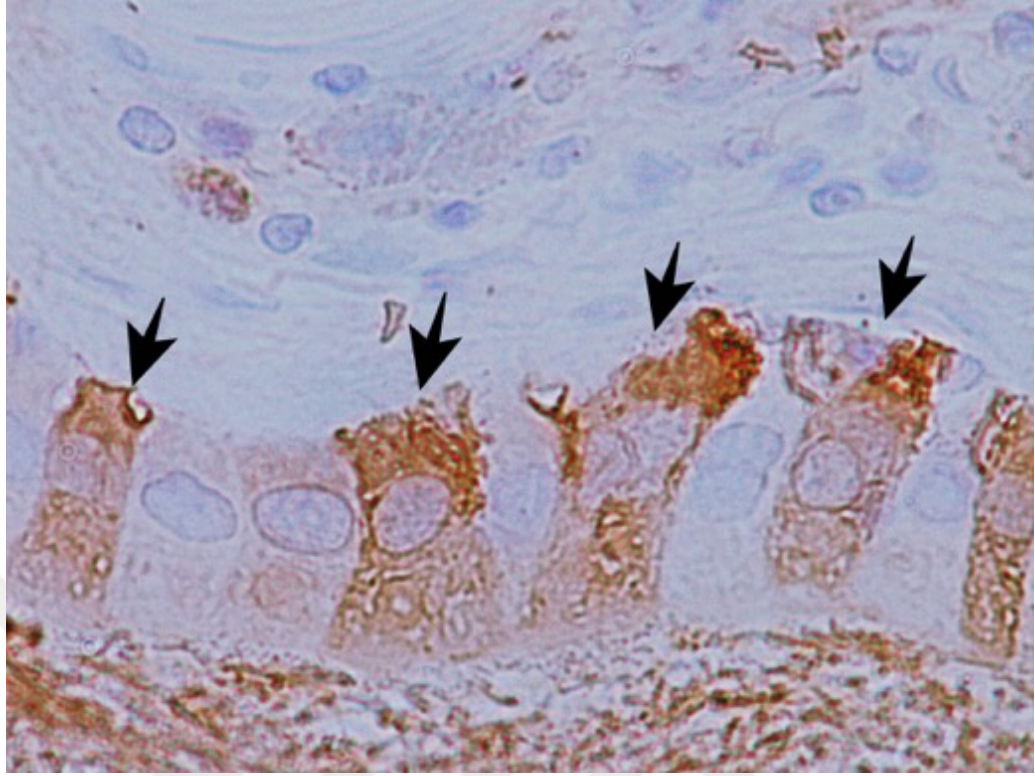
Şekil 4.42. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Crisp-1 immün işaretleme, 100x



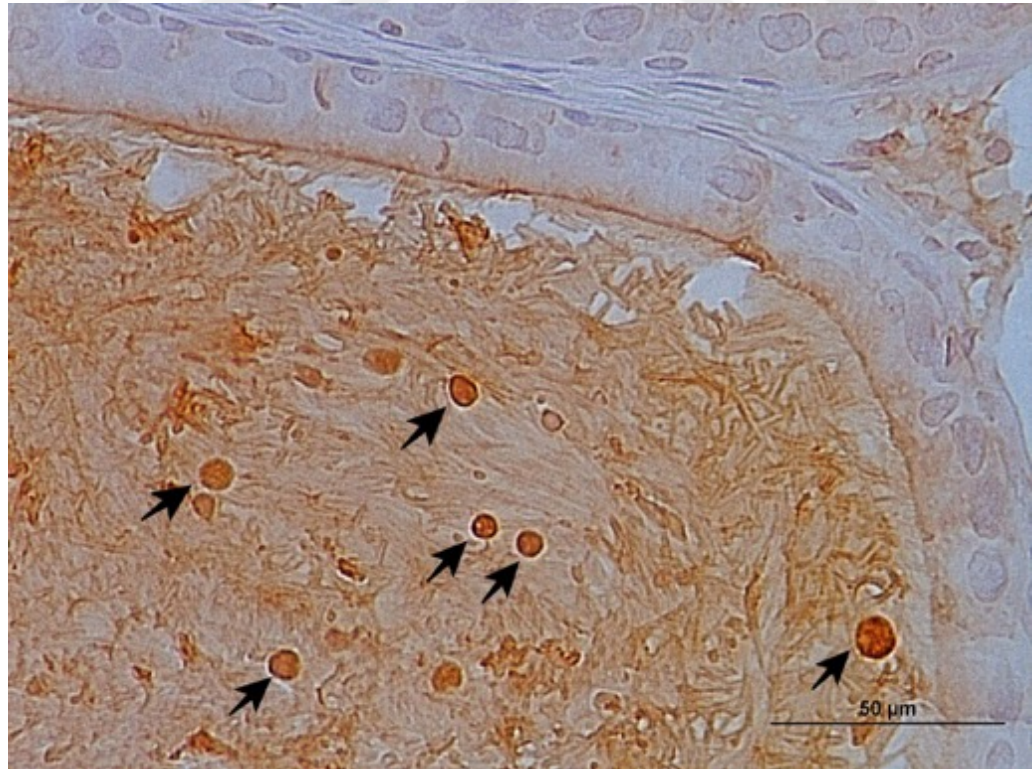
Şekil 4.43. Diyabet grubuna ait epididimis, Stereosilyum, epitel hücreleri (→) ve tübül lümeninde (*) pozitif boyanma, Crisp-1 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.44. Tedavi grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan çok sayıda epitel hücresi (→) Crisp-1 immün işaretleme, 40x



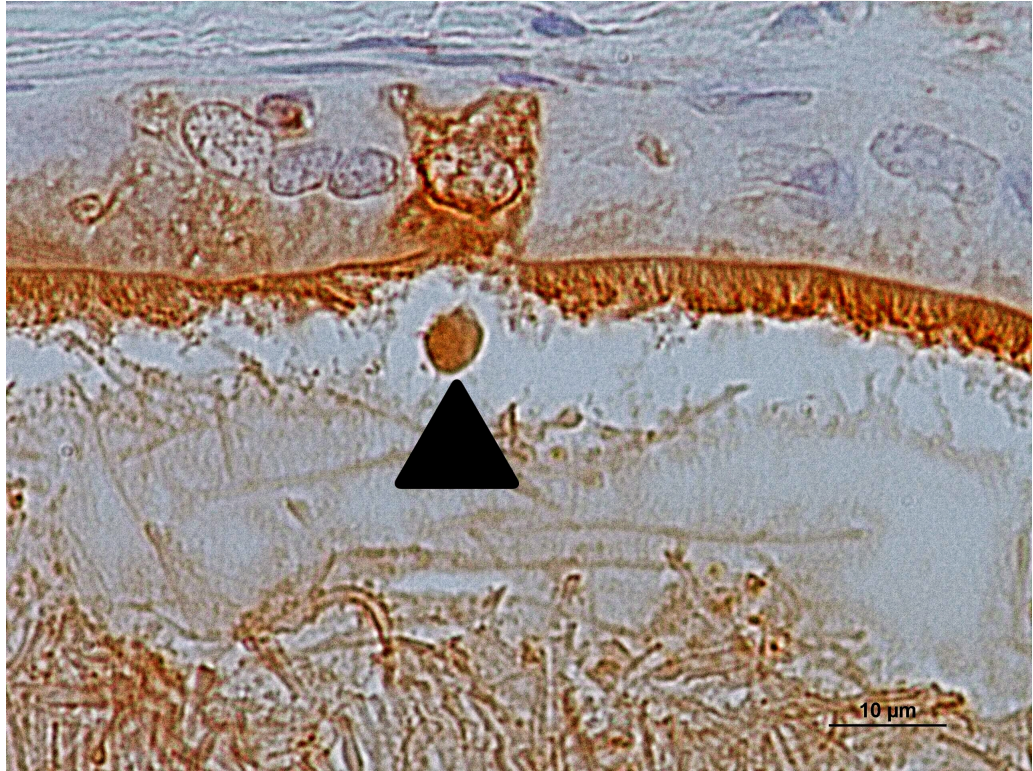
Şekil 4.45. Tedavi grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan epitel hücreleri (→) , Crisp-1 immün işaretleme, 100x



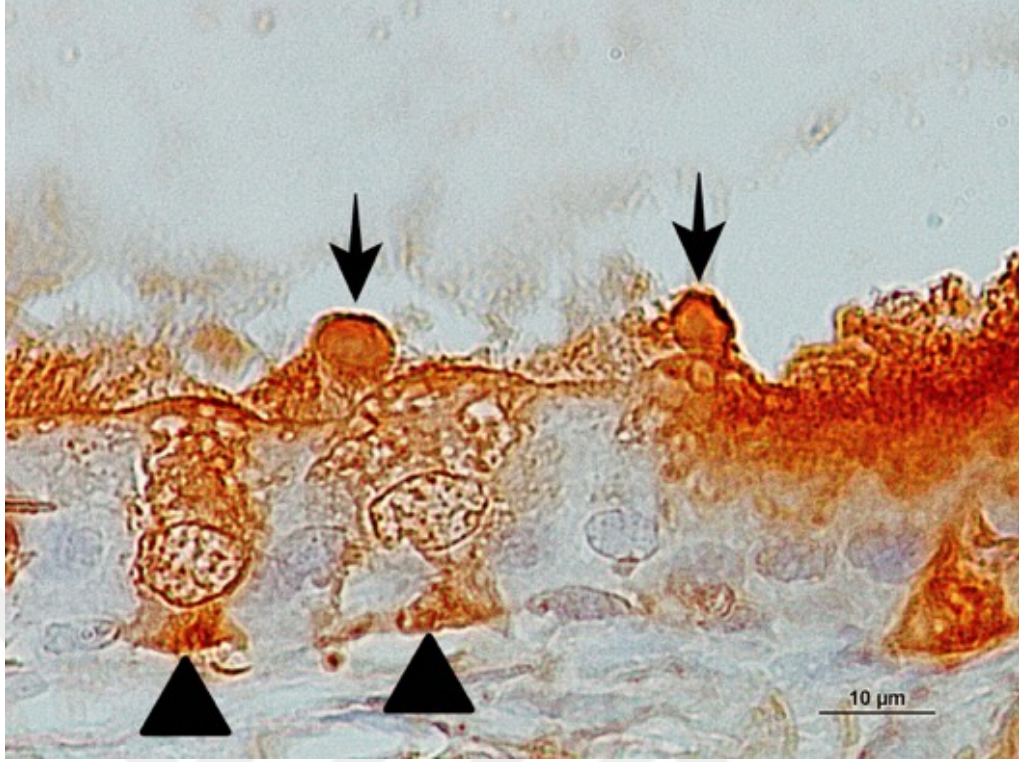
Şekil. 4.46. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan vezikül (epididimozom) yapıları (→) , Crisp-1 immün işaretleme, 40x



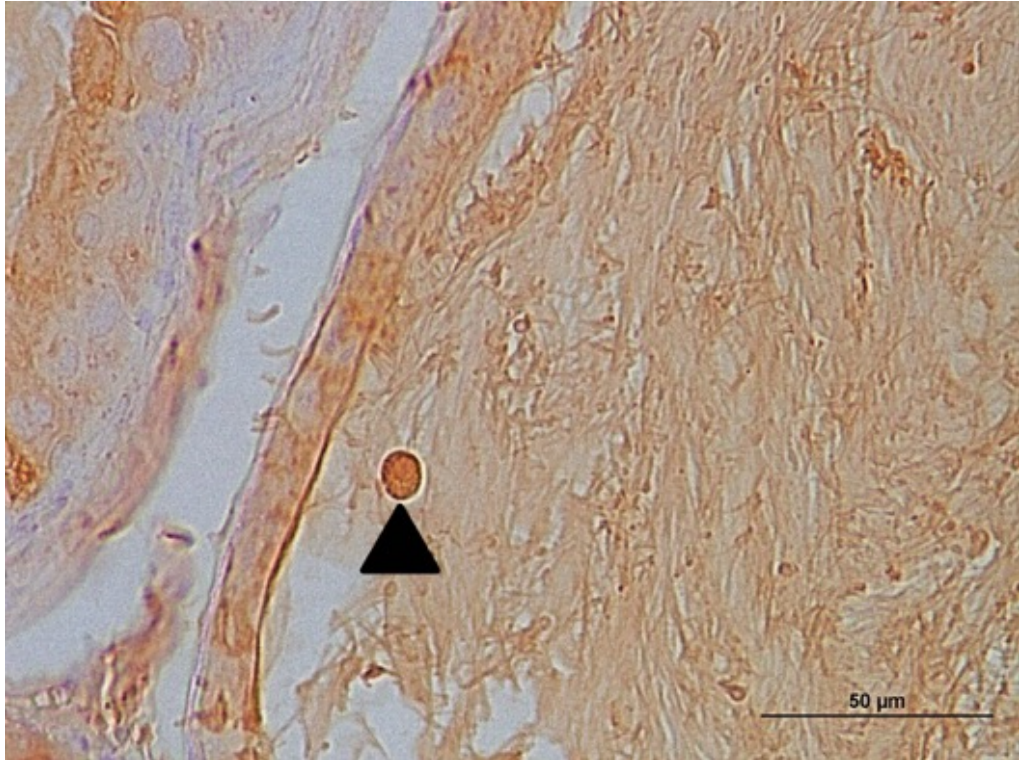
Şekil 4.47. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan epitel hücresi (►), vezikül (epididimozom) yapıları (→) ve lümendeki sperm (✱) Crisp-1 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.48. Sham kontrol grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan epitel hücresi ve vezikül (epididimozom) yapısı (▲), Crisp-1 immün işaretleme, 100x



Şekil 4.49. Diyabet grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan epitel hücreleri (▲) ile vezikül (epididimozom) yapıları (→) Crisp-1 immün işaretleme, 100x



Şekil 4.50. Tedavi grubuna ait epididimis, Pozitif boyanan vezikül (epididimozom) yapısı (▲) Crisp-1 immün işaretleme, 40x

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplarda serumda MDA, Testosteron ve FSH düzeylerine bakıldı. Elde edilen değerler tablo (4.8, 4.9, 4.10) ve grafiklerde (4.5, 4.6, 4.7) gösterildi.

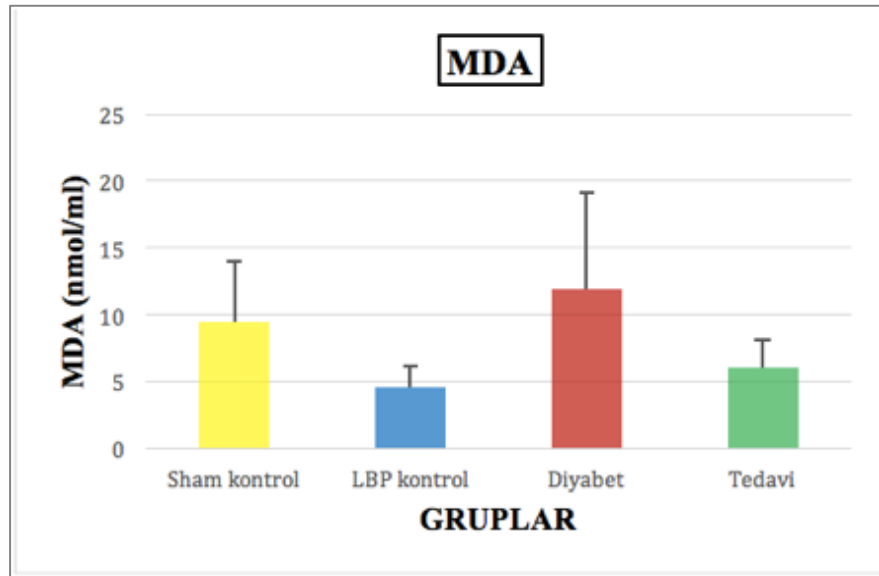
4.3.1. MDA (Malondialdehit)

Sham kontrol ve diyabet gurupları arasında MDA açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.768$, $p>0.05$). Diyabet ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı. ($p=0.050$, $p\leq 0.05$). Sham kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.065$, $p>0.05$)

Diyabetik grupta MDA değerlerinde az miktarda da olsa artışın olması beklendiği gibi lipid membran hasarını gösterdi. Tedavi grubunda MDA'nın anlamlı olarak düştüğü, yani lipid peroksidasyonunun azaldığı görüldü. Tedavi grubunun MDA değerleri sham kontrol grubu değerlerine yakın olarak tespit edildi.

Tablo 4.8. Serumda tespit edilen MDA değerleri

Gruplar	Sham kontrol ($\pm$ SD)	LBP kontrol ($\pm$ SD)	Diyabet ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
MDA (nmol/ml)	9,51 $\pm$ 4,44	4,62 $\pm$ 1,55	11,89 $\pm$ 7,23	5,99 $\pm$ 2,10



Grafik 4.5. Tüm gruplar için ölçülen MDA değerleri

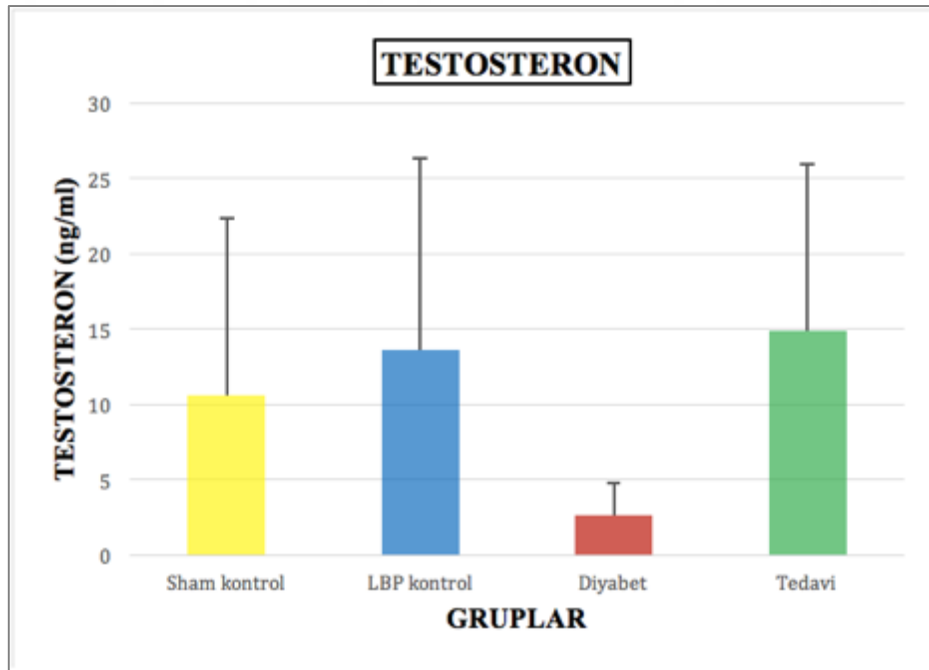
4.3.2. Testosteron

Sham kontrol ve diyabet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p=0.015$, $p\leq 0.05$). Diyabet ve tedavi grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p=0.003$, $p\leq 0.05$). Sham kontrol ile tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0.515$, $p>0.05$).

Diyabet grubunda testosteron değerlerinin anlamlı olarak düşmesi beklendiği gibi erkek üreme sistemindeki hasarı ve spermatogenezin olumsuz etkilendiğini gösterdi. Tedavi grubunda, testosteronun anlamlı olarak arttığı yani spermatogenezin olumlu etkilendiği görüldü. Ayrıca tedavi grubunun testosteron değerleri sham kontrol grubu ile anlamlı bir fark göstermeyerek birbirine yakın olarak tespit edildi.

Tablo 4.9. Serumda tespit edilen Testosteron değerleri

Gruplar	Sham kontrol ($\pm$ SD)	LBP kontrol ($\pm$ SD)	Diyabet ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Testosteron (ng/ml)	10,61 $\pm$ 11,77	13,58 $\pm$ 12,71	2,69 $\pm$ 2,06	14,87 $\pm$ 11,08



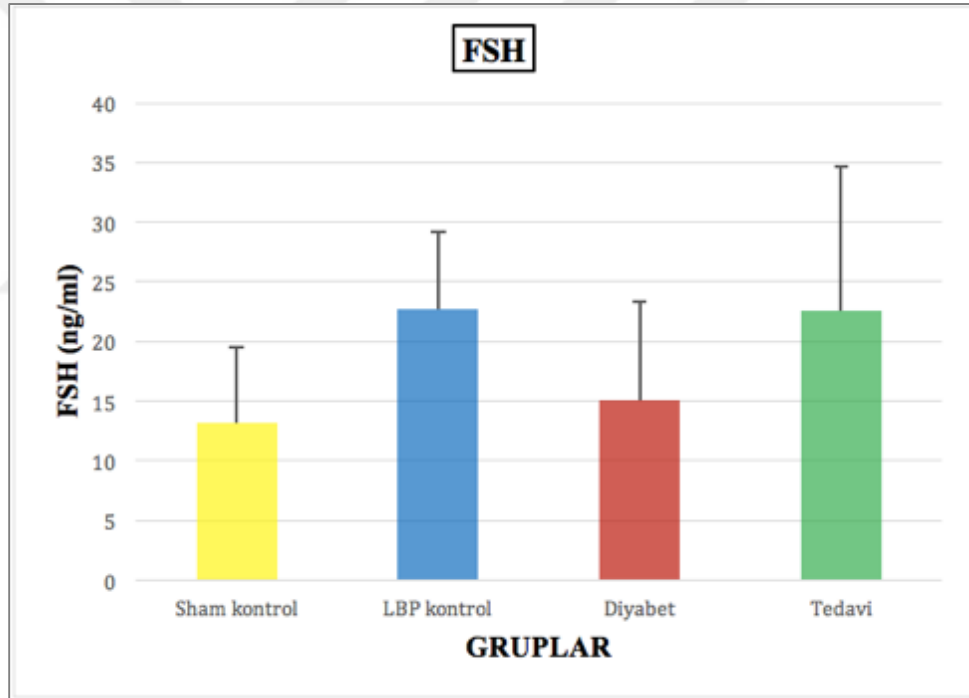
Grafik 4.6. Tüm gruplar için ölçülen Testosteron değerleri

4.3.3. FSH (Folikül uyarıcı hormon)

Grupların tespit edilen FSH değerleri Tablo 4.10. ve Grafik 4.7.'de gösterilmiştir. Bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.112$, $p>0.05$). Özellikle fark beklenen iki grup olan diyabet ve tedavi grupları arasında da anlamlı bir fark yoktu ($p=0.356$, $p>0.05$).

Tablo 4.10. Serumda tespit edilen FSH değerleri

Gruplar	Sham kontrol ($\pm$ SD)	LBP kontrol ($\pm$ SD)	Diyabet ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
FSH (ng/ml)	13,14 $\pm$ 6,43	22,75 $\pm$ 6,43	15,07 $\pm$ 8,27	22,59 $\pm$ 12,05



Grafik 4.7. Tüm gruplar için ölçülen FSH değerleri

5. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus (DM), dünya genelinde oldukça yaygın bir metabolik hastalık olup en önemli komplikasyonlarından biri erkek üreme sisteminde spermatogenik fonksiyon bozukluğudur (129-133).

Anormal spermatogenez ve spermin fonksiyon bozukluğu ile ortaya çıkan erkek infertilitesi dünya genelinde artış gösteren önemli bir problemdir (134-136).

Oksidatif stres diyabetle birlikte artış gösterir ve üreme fonksiyonunu etkileyip hasar verir. Organizmadaki antioksidan üretimi ile serbest oksijen radikal üretimi dengesinin bozulması sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, hem testis hem de epididimis dokularına direkt olarak zarar verir (137).

Diyabete bağlı oksidatif stres özellikle DNA bütünlüğüne, nükleik asitlere, proteinlere ve sperm plazma membranındaki yağ asitlerine hasar vererek sperm kalitesini bozar (137).

Crisp-1 proteini; kapasitasyon, sperm yumurta etkileşimi ve gamet füzyonu gibi önemli olaylarda rol alarak fertilizasyonu düzenleyen moleküllerden biridir. Epididimal epitel hücrelerinden salgılanıp lümene verilen Crisp-1 protein epididimal geçiş sırasında sperm yüzeyine bağlanır (17, 18).

Lycium barbarum, geleneksel Çin tıbbında yüzyıllardır tedavi amaçlı kullanılan bir bitkidir. *Lycium barbarum* polisakkaritleri (LBP) ise bu bitkiden elde edilen temel aktif bileşikler olup antioksidan, anti-hiperglisemik, anti-apoptotik ve fertilite artırıcı özellikleriyle dikkat çekmektedir (138).

Yapılan kaynak taramalarında; LBP'nin diyabete bağlı oksidatif stres sonucu oluşan erkek üreme sistemi hasarına etkisi ile ilgili çalışmaların çok az sayıda olduğu görülüp, fertilizasyonda önemli roller üstlenen Crisp-1 protein ekspresyonuna etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sönmez ve arkadaşları, diyabetin testis dokusunda seminifer tübül bütünlüğünde bozukluk, konjesyon, vakuol oluşumu, tübül lümeninde hücre döküntüleri gibi etkilerini gözlemlediklerini bildirmişlerdir (139). Ramzy ve arkadaşları diyabet grubuna ait testis dokusunda interstisyel alandaki bağ dokusunda artış gözlemlediklerini bildirmişlerdir (140). Mohamed ve Gawad yaptıkları çalışmada diyabet oluşturulan grubun testis dokusunda seminifer tübüllerin

bütünlüğünde bozukluk, tübül içerisinde vakuolizasyon ve intertübüler bağ dokuda kalınlaşma gözlemlenmiştir (141). Bizim çalışmamızın bulguları da bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olup; diyabetin, testis dokusunda intertübüler bağ dokusunu artırdığı, seminifer tübüller içerisindeki spermatogonyal hücreler arasında vakuol yapılarını oluşturduğu, interstisyel damarlarda konjesyon, genel tübül bütünlüğünde bozukluk ve lümende hücre döküntüsü oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. Önceki çalışmalardan farklı olarak testis dokusunda intertübüler alanlarda ödem de gözlenmiştir.

Cheng ve Kong yaptıkları çalışmada ethanol ile indükledikleri oksidatif stres hasarında *Lycium barbarum* polisakkaritleri kullanarak lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (142). Zhang ve arkadaşları, toksik bir madde olan Bisphenol-A ile indükledikleri testis hasarında *Lycium barbarum* polisakkaritlerinin testisteki spermatogenik hücre bütünlüğünü normale döndürdüğünü, MDA seviyesini azalttığını ve testosteron düzeyini de anlamlı olarak artırdığını bildirmişlerdir (26). Ramzy ve arkadaşları diyabetle indüklenen oksidatif stresin testis dokusunda MDA düzeyinde artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir (140). Mohamed ve Gawad yaptıkları çalışma sonucunda diyabet grubunda MDA düzeyinde anlamlı bir artış olduğunu, plazma testosteron seviyesinin ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gösterdiğini rapor etmişlerdir (141). Li yaptığı çalışmada diyabetin sebep olduğu oksidatif strese karşılık LBP uygulamıştır ve MDA'da anlamlı bir düşüş tespit ederek LBP'nin diyabetik sıçanlarda anormal seviyeye ulaşmış lipid peroksidasyon üretimini normale döndürdüğünü bildirmiştir (126). Fernandes ve arkadaşlarının çalışması sonucunda ise deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda FSH düzeyinin hiperglisemiden etkilenmeyerek azalma göstermediği bildirilmiştir (143). Dursun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, testiste torsiyon uygulayarak iskemik hasara karşı *Lycium barbarum* ekstresinin koruyucu etkisini araştırmışlardır. *Lycium barbarum* ekstresi verilen tedavi grubunda oksidan seviyesinin azalarak total antioksidan kapasitesinin anlamlı olarak arttığını rapor etmişlerdir (25).

Çalışmamızdaki biyokimyasal incelemeler sonucunda, diyabet grubuna ait sıçanlarda serum MDA seviyesinin anlamlı olarak arttığı ($p \leq 0.05$), LBP verilen tedavi grubunda ise bu seviyenin anlamlı olarak azaldığı ($p > 0.05$) tespit edilmiştir.

Ayrıca serum Testosteron düzeyi diyabet grubunda anlamlı bir düşüş gösterirken ($p \leq 0.05$) LBP grubunda anlamlı olarak artmıştır ($p \leq 0.05$). Serumda ölçülen FSH düzeyinin ise gruplar arasında fark göstermediği tespit edilmiştir.

Histolojik incelemelerde, testisteki intertübüler bağ dokusunun diyabet grubunda artış gösterdiği gözlenmiştir. LBP verilen tedavi grubuna ait testis dokusunda ise intertübüler bağ dokusu gerileyerek sham kontrol grubuna benzer şekilde gözlemlenmiştir. Ayrıca diyabet grubunda sıklıkla gözlenen spermatogonyal hücreler arasındaki vakuol oluşumunun LBP verilen tedavi grubunda azaldığı görülmüştür.

Testiste meydana gelen oksidatif stres, hücre apoptozisini uyaran ana faktörlerden biridir (143). Yapılan çalışmalar, apoptozisin diyabete bağlı spermatogenik fonksiyon bozukluğunda çok önemli rol oynadığını göstermektedir (137, 144).

Kanter ve arkadaşları, testis dokusunda TUNEL yöntemi ile belirledikleri apoptotik hücrelerin deneysel diyabet oluşturdukları grupta anlamlı olarak arttığını tespit etmişlerdir (144).

Shi ve arkadaşları ise LBP'nin, diyabetik sıçanların testis dokularında apoptozis göstergesi olan caspase-3 ekspresyonunu azaltarak anti-apoptotik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (145).

Çalışmamız sonucunda, diyabet grubuna ait testis dokusundaki TUNEL pozitif apoptotik hücre sayılarının anlamlı olarak arttığı ($p \leq 0.05$), LBP verilen tedavi grubunda ise TUNEL pozitif apoptotik hücre sayılarında anlamlı bir azalma olduğu ($p \leq 0.05$) tespit edilmiştir. Testis dokularında yapılan Caspase-3 immün işaretleme çalışmamızdaki bulgular, önceki çalışmalarla uyumlu olup, diyabet grubundaki caspase-3 ekspresyonunun sham kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı ($p \leq 0.05$), LBP verilen tedavi grubunda ise anlamlı olarak azaldığı ($p \leq 0.05$) tespit edilerek LBP'nin caspase-3 aktivasyonunu azalttığı görülmüştür.

Kim ve Moley 'in çalışmasında diyabet grubunun sperm konsantasyonu ve sperm hareketliliğinde anlamlı düşüş olduğu bildirilmiştir (12). Shi ve arkadaşları diyabetin sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalmaya sebep olduğunu, LBP'nin ise sperm hücre bütünlüğünü koruyarak sperm parametrelerini artırdığını bildirmişlerdir (145).

Çalışmamızda elde edilen veriler önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olup, diyabet grubuna ait hareketli sperm sayısının anlamlı olarak azaldığı ($p \leq 0.05$), LBP'nin ise hareketli sperm sayısını anlamlı olarak artırdığı tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Ancak toplam sperm sayısı açısından, diyabet grubu ile sham kontrol grubu kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). LBP verilen tedavi grubunun toplam sperm sayısında ise anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$).

Crisp-1 proteini ilk olarak Cameo ve Blaquier tarafından rat epididimisinde tanımlanmıştır. Cameo ve Blaquier Crisp-1'in epididimiste salgılandıktan sonra epididimal geçişte sperm yüzeyine yerleştiğini bildirmişlerdir (15). Cuasnicu ve arkadaşları, Crisp-1 proteinini bloke etme amacıyla poliklonal anti-Crisp-1 uyguladıklarında spermin oositle füzyonunun engellendiği rapor edilmiştir (146). Busso ve arkadaşları epididimal Crisp-1 proteinin yumurta yüzeyindeki ilgili bölgelere bağlanarak gamet füzyonunda ve sperm-ZP etkileşiminde rol aldığını bildirmişlerdir (48). Da Ros ve arkadaşları, Crisp-1 proteinden yoksun knock-out farelerle yaptıkları çalışmada Crisp-1 proteini olmayan spermin, fertilizasyon yeteneğinde ve füzyon kabiliyetinde kontrollere kıyasla anlamlı bir azalma gösterdiğini, dolayısıyla hem ZP ile etkileşim hem de füzyon olayında dezavantajlı olduğunu bildirmişlerdir (19). Ernesto ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Crisp-1 proteininin hiperaktiviteyi azaltıp linear hareketi artırdığını ve kalsiyum kanallarını inhibe ederek CatSper aktivitesini ve kapasitasyonu düzenleyen bir protein olduğunu rapor etmişlerdir (147).

Epididimozomlar, epididimal proteinlerin sperme transferinde rol alan membranöz veziküller olarak tanımlanarak Sullivan ve arkadaşları tarafından rapor edilmişlerdir (148, 149). Thimon ve arkadaşları, epididimozomdaki protein kompozisyonlarını araştırıp Crisp-1 proteininin de dahil olduğu birçok protein içerdiğini tespit ederek, Crisp-1 proteininin epididimiste salgılandıktan sonra epididimozomlarda toplandığını rapor etmişlerdir (150). Reddy ve arkadaşları yaptıkları immünohistokimyasal çalışmada; epididimisin kaput, korpus ve kauda bölgelerinde Crisp-1 pozitif boyanma gözlemlemişlerdir. Pozitif boyanmanın özellikle epididimis epitelindeki esas hücrelerin sitoplazmalarında, epitel boyunca uzanan stereosilyumlarda ve epididimal lümendeki spermelerde olduğunu

bildirmişlerdir. Ayrıca epididimozom yapılarında da pozitif boyanma gözlemlediklerini bildirmeleri Thimon ve arkadaşlarının yaptığı proteomik analiz çalışması sonucu ile de uyumludur (43).

Yaptığımız immünohistokimyasal çalışmada, bütün gruplara ait epididimis dokularında Crisp-1 immün işaretleme yapılarak epitel hücrelerin sitoplazmalarında Crisp-1 pozitif boyanma gözlemlenmiş olup çalışmamız Reddy ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir. Pozitif hücre sayımı sonucunda Crisp-1 protein ekspresyonu, diyabet grubunda sham kontrole kıyasla anlamlı bir azalma göstermemiştir ($p>0.05$). Ancak LBP verilen tedavi grubunda Crisp-1 protein ekspresyonunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p\leq 0.05$). Bu çalışma ile fertilitate artırıcı etkisi bilinen LBP'nin ilk kez Crisp-1 protein ekspresyonuna etkisi araştırılıp, anlamlı bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir.

Yapılan kaynak taramalarında, epididimis epitelinden salgılandığı bilinen Crisp-1 protein ekspresyonuna ait mikroskobik görüntülerin çok az sayıda olduğu görülüp, Crisp-1 pozitif boyanma sergileyen epididimozom veziküllerine ait mikroskobik görüntülere rastlanılmamıştır. Crisp-1 immün işaretleme çalışmamızda, epitel boyunca uzanan stereosilyumların ve epididimal lümende bulunan spermelerin Crisp-1 pozitif boyandığını görülmüştür. Epididimal epitelden çıkıntı yaparak lümene uzanan ve epididimal lümende de serbest halde bulunan yuvarlak veziküllerin Crisp-1 pozitif boyanma gösterdiği gözlemlenerek bunların Crisp-1 protein içeren epididimozom vezikülleri olabileceği kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Deneysel diyabet oluşturulup 15 gün LBP uygulanan bu çalışma sonucunda diyabet grubuna göre LBP tedavi grubunda MDA seviyesinin azalması LBP'nin diyabete bağlı oksidatif stresi anlamlı ölçüde engellediğini göstermiştir.
2. LBP verilen tedavi grubunda Testosteron seviyesinin anlamlı ölçüde artması, diyabetin sebep olduğu erkek üreme sisteminin hormonal hasarında LBP'nin iyileştirici etkisini göstermiştir.
3. Testis dokusundaki Caspase-3 aktivasyonunun diyabet grubunda artış gösterdiği, ancak LBP verilen tedavi grubunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Tedavi grubundaki Caspase-3 aktivasyonunun azalması, LBP'nin anti-apoptotik etkisini göstermiştir.
4. Diyabet grubundaki TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısındaki artışın LBP uygulanan tedavi grubunda büyük ölçüde azalmasıyla LBP'nin erkek üreme sistemindeki apoptozise karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.
5. Sperm hareketliliğinin diyabet grubunda anlamlı ölçüde azalmasına karşılık LBP uygulanan grupta artış göstermesi ile LBP'nin sperm kalitesini artırıcı etkisi gösterilmiştir.
6. Fertilizasyonda önemli roller üstlenen Crisp-1 protein ekspresyonunun diyabet grubunda anlamlı bir değişikliğe uğramadığı görülmüştür. Ancak LBP uygulanan tedavi grubunda Crisp-1 protein ekspresyonundaki artış, LBP'nin erkek üreme sisteminde fertilitayı artırdığı yönünde yorumlanmıştır.
7. Bu çalışma ile diyabete bağlı erkek infertilitesinde LBP'nin koruyucu ve iyileştirici etki gösterdiği, Crisp-1 ekspresyonunu artırarak fertilitate kabiliyetini artırıcı bir antioksidan olduğu tespit edilmiştir.
8. Erkek infertilite probleminin genellikle hücresel ve moleküler seviyede olması sebebiyle tedavi çalışmalarının çoğu sınırlı bir başarı oranı yakalanmaktadır. Bu sebeple fertilizasyonda rol alan proteinlerle yapılan moleküler çalışmalar yaygınlaşmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Alberti KG, Zimmet PZ.** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, **1998**; 15: 539–553.
2. **Rytter E, et al.** Glycemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well- controlled type-2 diabetes subjects. *British J Nutri*, **2009**; 101:1423-1426.
3. **Takeshi K, et al.** Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, **2002**; 55(1): 65-85.
4. Noyan A. Fizyoloji Ders Kitabı. 6 Baskı, Ankara:Meteksa AŞ, **1989**; 1048-1066.
5. **Altan VM, Yıldızoğlu N, Öztürk Y.** İnsülin, oral hipoglisemik ilaçlar, glucagon ve somatostatin. Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara: Gazi Kitabevi, **2000**; 366.
6. **Association AD.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **2010**; 33: 62–69.
7. **Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, et al.** Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod*, **2007**; 22: 1871–1877.
8. **Kilarkaje N, Al-Hussaini H, Al-Bader MM.** Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *Eur J Pharmacol*, **2014**; 737: 29–40.
9. **Cavallini G.** Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl*, **2006**; 8: 143– 157.
10. **Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. *Physiol Reprod*, **1994**; 1: 189–317.
11. **Bucci D, Rodriguez-Gil JE, Vallorani C, Spinaci M, Galeati G, et al.** GLUTs and mammalian sperm metabolism. *J Androl*, **2011**; 32: 348–355.
12. **Kim ST, Moley KH.** Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction*, **2008**; 136: 313–322.
13. **Sakkas D, Urner F, Menezo Y, Leppens G.** Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos in vitro. *Biol Reprod*, **1993**; 49: 1288–1292.
14. **Baccetti B, la Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V.** Insulin- dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-

- pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod*, **2002**; 17(10): 2673-2677.
15. **Cameo MS, Blaquier JA.** Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocr*, **1976**; 69(1), 47-55.
 16. **Kohane AC, Cameo MS, Piñeiro L, Garberi JC, Blaquier JA.** Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol Reprod*, **1980**; 23: 181–187.
 17. **Kohane AC, González Echeverría FM, Piñeiro L, Blaquier JA.** Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol Reprod*, **1980**; 23: 737–742.
 18. **Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, Morgenfeld MM, Busso D, et al.** Relationship between the association of rat epididymal protein “DE” with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol Reprod Dev*, **2000**; 56: 180–188.
 19. **Da Ros VG et al.** From the epididymis to the egg: participation of CRISP proteins in mammal fertilization. *Asian J Androl*, **2015**;17:711-715.
 20. **Cohen et al.** Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian J Androl*, **2007**; 9:528-532.
 21. **Maldera JA, Weigel Munoz M, Chirinos M, Busso D, Raffo FG, et al.** Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. *Mol Hum Reprod*, **2014**; 20:341-349.
 22. **Cohen et al.** Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in gamete fusion. *Biol Reprod*, **2000**; 63:462-468.
 23. **Cohen et al.** Cysteine rich secretory proteins and their role in mammalian fertilization. *Biol Res*, **2011**; 44:135-138.
 24. **Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, et al.** Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol*, **2008**; .320:12-18 .
 25. **Dursun R, Zengin Y, Gündüz E, et al.** The protective effect of goji berry extract in ischemic reperfusion in testis torsion. *Int J Clin Exp Med*, **2015**; 8(2):2727-2733.
 26. **Zhang C, Wang A, Sun X, et al.** Protective effect of Lycium barbarum Polysaccharides on testis spermatogenic injury induced by Bisphenol-A in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**.

27. **Jing L, Cui G, Feng Q, Xiao Y.** Evaluation of hypoglycemic activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*. *Afr J Med Med Sci*, **2009**; 6(4):579-584.
28. **Luo Q, Li Z, Huang X, Yan J, Zhang S, Cai YZ.** *Lycium barbarum* polysaccharides: Protective effects against heat-induced damage of rat testes and H₂O₂-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats. *Life Sci*, **2006**; 79(7): 613-621.
29. **Luo Q, et al.** The effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the male rats .30 reproductive system and spermatogenic cell apoptosis exposed to low-dose ionizing irradiation. *J Ethnopharmacol*, **2014**; 154(1):249-258.
30. **Huang X L, et al.** Study on protective effect of *lycium barbarum* polysaccharides on testis tissue damage of male rats. *China Public Health*, **2003**.
31. **Jin M, Huang Q, Zhao K, Shang P.** Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. *Int J Biol Macromol*, **2013**; 54:16-23.
32. **Ross MH and Pawlina W.** Histology: A text and atlas : with correlated cell and molecular biology. 6th edition, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, **2006**.
33. **Kierszenbaum AL and Tres LL.** Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 6th edition, Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, **2012**.
34. **Moore KL, Persaud TVN and Torchia MG.** The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 6th edition, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, **2008**.
35. **Mescher AL and Junqueira LCU.** Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th edition, New York: McGraw Hill Medical, **2013**.
36. **Sharpe RM.** Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, editor; , Neill JD, editor. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, Ltd; **1994**: 1363-1434.
37. **Raheem AA and Ralph D.** Male Infertility: Causes and Investigations. *Trends in Urology & Men's Health*, **2011**: 2(5), 8-11.
38. **Robaire B, Hinton B and Orgebin-Crist MC.** The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: From Molecules to Clinical Practice: a Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens. Springer Science and Business Media, **2012**: 393.

39. **Hardy DM, Huang TTF, Driscoll WJ, Tung KSK and Wild GC.** Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa, *Biol. Reprod.* **1988**; 38, 423–437.
40. **Kasahara M, Gutknecht J, Brew K, Spurr N and Goodfellow PN.** Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics*, **1989**; 5(3), 527-534.
41. **Haendler B, Krätzschar J, Theuring F and Schleuning WD.** Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology*, **1993**; 133(1), 192-198.
42. **Udby L, Bjartell A, Malm J, Egesten A, Lundwall Å, Cowland JB and Kjeldsen L.** Characterization and Localization of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) in the Human Male Reproductive Tract. *J Androl*, **2005**; 26(3), 333-342.
43. **Reddy T, Gibbs GM, Merriner DJ, Kerr JB and O'Bryan MK.** Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. *Dev Dyn*, **2008**; 237(11), 3313-3323.
44. **Garberi JC, Kohane AC, Cameo MS and Blaquier JA.** Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol Cell Endocrinol*, **1979**; 13(1), 73-82.
45. **Rochwerger L, Cohen DJ and Cuasnicú PS.** Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev Biol*, **1992**; 153(1), 83-90.
46. **Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, Morgenfeld MM, Busso D and Cuasnicú PS.** Relationship between the association of rat epididymal protein “DE” with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol Reprod Dev*, **2000**; 56(2), 180-188.
47. **Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM and Hamilton DW.** Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod*, **2003**; 69(2), 572-581.
48. **Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A and Cuasnicu PS.** A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod*, **2007**; 77(5), 848-854.
49. **Bansal AK and Bilaspuri GS.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, **2010**; 2011.

50. **Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA.** Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, **2000**; 15;28(10):1456-1462.
51. **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN.** Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery*, **1983**;94; 415-422.
52. **Becker LB.** New concepts in active oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*, **2004**; 61: 461-470.
53. **Berk BC.** Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, **2007**; 118, 209.
54. **Metcalfe NB and Alonso-Alvarez C.** Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Func Ecol*, **2010**; 24(5), 984-996.
55. **Agarwal A and Said TM.** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU International*, **2005**; 95(4), 503-507.
56. **Lieberman M and Marks AD.** Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins, **2009**.
57. **Das UN.** Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, **2000**; 215(1), 145-152.
58. **Nelson KK and Melendez JA.** Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med*, **2004**; 37(6), 768-784.
59. **Tarpey MM and Fridovich I.** Methods of detection of vascular reactive species. *Circ Res*, **2001**; 89(3), 224-236.
60. **Nordberg J and Arnér ES.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, **2001**; 31(11), 1287-1312.
61. **Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM.** Lehninger Principles of Biochemistry. 4th edition, New York: W.H. Freeman and Company, **2005**.
62. **Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, **1997**; 82(2), 291-295.
63. **Halliwell B.** Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, **1999**; 31(4), 261-272.
64. **Cheeseman KH and Slater TF.** An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, **1993**; 49(3), 481-493.
65. **Freeman BA and Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **1982**; 47(5), 412-426.

66. **Weiss SJ and LoBuglio AF.** Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab invest*, **1982**; 47(1), 5-18.
67. **Kavas GÖ.** Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **1989**; 9(1), 1-8.
68. **Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A.** Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Medical Journal*, **1992**; 3(4).
69. **Sinclair AJ, Barnett AH and Lunec J.** Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med*, **1990**; 43(5), 334-344.
70. **Murray RK.** Harper's illustrated biochemistry. 29th edition, New York: McGraw-Hill, **2012**.
71. **Baykal Y, Kocabalkan F:** Serbest radikalleri ve hücre hasarı. *Sendrom*, **2000**; 9:31-36.
72. **Netto LE, Kowaltowski AJ, Castilho RF and Vercesi AE.** Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol*, **2002**; 348, 260-270.
73. **Mesci S.** Rat overinde iskemi reperfüzyon hasarında selenyum ve C vitaminin etkinliği, Tıpta Uzmanlık Tezi, Düzce Üniversitesi, Düzce, **2011**: 36.
74. **Cutler RG.** Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr*, **1991**; 53(1), 373-379.
75. **Davies KJ.** Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In Biochemical Society Symposia, Portland Press Limited. **1995**; 61: 1-31.
76. **Serg M, Kampus P, Kals J, Zagura M, Zilmer M, Zilmer K and Eha J.** Nebivolol and metoprolol: long-term effects on inflammation and oxidative stress in essential hypertension. *Scand J Clin Lab Invest*, **2012**; 72(5), 427-432.
77. **Clarkson PM and Thompson HS.** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutri*, **2000**; 72(2), 637-646.
78. **Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U and Shaw JE.** Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, **2014**; 103(2), 137-149.
79. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **2014**; 37: 81-90.
80. **Eizirik DL, Colli ML and Ortis F.** The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, **2009**; 5(4): 219-226.

81. **Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA and Butler PC.** β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **2003**; 52(1), 102-110.
82. **Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM.** Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, **2006**; 444:7121, 840-846.
83. **Risérus U, Willett WC and Hu FB.** Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in lipid research*, **2009**; 48(1), 44-51.
84. **Acker K, Apelqvist J and Bakker K.** Diyabetik Ayağın Epidemiyolojisi. Çeviri: Yeşil S. İçinde: Acker K (editör). Diyabetik Ayakta Uluslararası Konsensus, **1999**; 20-27.
85. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **2010**; 33: 62-69.
86. **Ceriello A.** Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, **2000**; 49(2), 27-29.
87. **Baynes JW and Thorpe SR.** Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, **1999**; 48(1), 1-9.
88. **Halliwell B and Gutteridge JM.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*, **1990**; 186, 1-85.
89. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM.** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*, **2002**; 23(5), 599-622.
90. **Pop-Busui R, Sima A and Stevens M.** Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Rev*, **2006**; 22(4), 257-273.
91. **Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, **2003**; 79:829–843.
92. **Kajimoto Y and Kaneto H.** Role of Oxidative Stress in Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, **2004**; 1011(1), 168-176.
93. **Colagiuri S, Falavigna M, Agarwal MM, Boulvain M, Coetzee E, Hod M, Schmidt MI.** Strategies for implementing the WHO diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract*, **2014**; 103(3), 364-372.
94. **Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ and Huang HF.** (2015). The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, **2015**; 17(6), 948.

95. **Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon, J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K and Van der Poel S.** The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology. *Hum Reprod*, **2009**; 24(11), 2683-2687.
96. **Glenn DR.** The hidden impact of diabetes on male sexual dysfunction and fertility. *Hum fertil*, **2003**.
97. **Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF.** Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta* **2013**; 1832(5):626-635.
98. **Zhao Y, Zhao H, Zhai X, Dai J, Jiang X, Wang G, et al.** Effects of Zn deficiency, antioxidants, and low-dose radiation on diabetic oxidative damage and cell death in the testis. *Toxicol Mech Methods*, **2013**;23(1):42-47.
99. **Jain GC, Jangir RN.** Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* **2014**;10(3):147-157.
100. **Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG.** The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cell Physiol Biochem*, **2011**;28:887-898.
101. **Khaki A, Khaki AA, Hajhosseini L, Golzar FS, Ainehchi N.** The anti-oxidant effects of ginger and cinnamon on spermatogenesis dysfunction of diabetes rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, **2014**;11(4):1-8.
102. **Elmore, Susan.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, **2007**; 35,4: 495-516.
103. **Duprez Linde, et al.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection*, **2009**; 11,13: 1050-1062.
104. **Majno G and Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*, **1995**; 146, 3–15.
105. **Wong RS.** Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, **2011**; 30,1: 87.
106. **Altunkaynak BZ and Elvan Ö.** Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?. *Tıp Araş Derg*, **2008**; 6,2: 93-104.
107. **Igney FH and Krammer PH.** Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**; 2: 277–288.
108. **Öktem S, Mustafa HÖ and Özol D.** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**; 2,1: 91-95.

109. **Payam Behzadi, Reza Ranjbar.** Caspases and Apoptosis. *Molecular ezymology and drug targets*, **2015**; 1:2,2.
110. **Porter, A. G., & Jänicke, R. U.** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, **1999**; 6(2).
111. **Güleş Ö, Ülker E.** Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2008**; 19(2), 73-78.
112. **Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K and Chakrabarti S.** Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res*, **2000**; 28(5), 342-347.
113. **Sainio-Pöllänen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O and Pöllänen P.** Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int J Androl*, **1997**; 20(4), 243-254.
114. **Bozdemir-Dönmez Y, Kizilay G, Topçu-Tarladaçalışır Y.** MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testes. *Acta Cir Bras*, **2014**; 29(10):644-650.
115. **Trindade AA, Simões AC, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT.** Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras*, **2013**;28(4):256-265.
116. **Pham-Huy LA, He H and Pham-Huy C.** Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, **2008**; 4(2), 89.
117. **Bouayed J and Bohn T.** Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2010**; 3(4), 228-237.
118. **Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H and Parajó JC.** Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, **2001**; 72(2), 145-171.
119. **Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L and Barikmo I.** The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition journal*, **2010**; 9(1), 3.
120. **Rosa SD, Cirillo P, Paglia A, Sasso L, Palma VD and Chiariello M.** Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach?. *Current vascular pharmacology*, **2010**; 8(2), 259-275.

121. **Nicolle C, Cardinault N, Aprikian O, Busserolles J, Grolier P, Rock E and Rémésy C.** Effect of carrot intake on cholesterol metabolism and on antioxidant status in cholesterol-fed rat. *European journal of nutrition*, **2003**; 42(5), 254-261.
122. **Wang PC, Zhao S, Yang BY, Wang QH and Kuang HX.** Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review. *Carbohydrate polymers*, **2016**; 148, 86-97.
123. **Jain GC and Jangir RN.** Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. *Pharmacognosy reviews*, **2014**; 8(16), 113.
124. **Huang M, Wang F, Zhou X, Yang H and Wang Y.** Hypoglycemic and hypolipidemic properties of polysaccharides from *Enterobacter cloacae* Z0206 in KKAY mice. *Carbohydrate Polymers*, **2015**; 117, 91–98.
125. **Chang LP, Cheng JH, Hsu SL, Liao BC, Wu TM and Chang CMJ.** Application of continuous supercritical anti-solvents for rapid recrystallization and purification of zeaxanthin dipalmitates from de-glycosides of *Lycium barbarum* fruits. *The Journal of Supercritical Fluids*, **2011**; 57(2), 155–161.
126. **Li XM.** Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol*, **2007**; 40(5), 461–465.
127. **Luo Q, Cai Y, Yan J, Sun M and Corke H.** Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci*, **2004**; 76(2), 137–149.
128. **Wang C, Chang S, Inbaraj BS and Chen B.** Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, **2010**; 120(1), 184–192.
129. **Amidu N, Owiredu WK, Alidu H, Sarpong C, Gyasi-Sarpong CK and Quaye L.** Association between metabolic syndrome and sexual dysfunction among men with clinically diagnosed diabetes. *Diabetology metabolic syndrome*, **2013**; 5(1), 42.
- 130.
131. **Abbasi Z, Fatemi Tabatabaei SR, Barati F, Mazaheri Y and Morovati H.** The effects of sesame oil on some reproductive parameters of male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, **2013**; 15(1), 94-99.
132. **Ahangarpour A, Oroojan AA, Heidari H, Ehsan G, Nooshabadi R, Reza M.** Effects of hydro-alcoholic extract of *Rhus coriaria* (Sumac) seeds on reproductive complications of nicotinamide-streptozotocin induced type-2 diabetes in male mice. *The World Journal of Men's Health*, **2014**; 32(3), 151-158.

133. **Ghanbari E, Nejati V, Najafi G, Khazaei M and Babaei M.** Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Fertil Steril*, **2015**; 9(1), 113.
134. **Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi S and Nejati V.** Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, **2013**; 3(4), 347.
135. **Oehninger S,** Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status, *J Androl*, **2000**; 21: 814–821. R.M.
136. **Sharpe RM, Irvine DS.** How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?. *British Medical Journal BMJ*, **2004**; 328: 447–451.
137. **Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, Mcmanus J, Lewis SEM.** Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome, *Hum Reprod*, **2010**; 25: 1594–1608.
138. **Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ and Ahmadi P.** Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, **2010**; 24(9), 1285-1291.
139. **Cheng J, Zhou ZW, Sheng HP, He LJ, Fan XW, He ZX and Cao C.** An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides. *Drug design, development and therapy*, **2015**; 9, 33.
140. **Sönmez MF, Karabulut D, Kilic E, Akalin H, Sakalar C, Gunduz Y and Dundar M.** The effects of streptozotocin-induced diabetes on ghrelin expression in rat testis: biochemical and immunohistochemical study. *Folia histochemica et cytobiologica*, **2015**; 53(1), 26-34.
141. **Ramzy MM, El-Sheikh AA, Kamel MY, Abdelwahab SA and Morsy MA.** Mechanism of testicular protection of carvedilol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian journal of pharmacology*, **2014**; 46(2), 161.
142. **Mohamed NA and Gawad HA.** Taurine dietary supplementation attenuates brain, thyroid, testicular disturbances and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes mellitus in male rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **2017**.
143. **Cheng D and Kong H.** The effect of Lycium barbarum polysaccharide on alcohol-induced oxidative stress in rats. *Molecules*, **2011**; 16(3), 2542-2550.
144. **Fernandes GS, Fernandez CD, Campos KE, Damasceno DC, Anselmo-Franci JA and Kempinas WD.** Vitamin C partially attenuates male

- reproductive deficits in hyperglycemic rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2011**; 9(1), 100.
145. **Kanter M, Aktas C and Erboga M.** Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol*, **2012**; 50(3), 719-725.
 146. **Shi GJ, Zheng J, Wu J, Qiao HQ, Chang Q, Niu Y and Yu JQ.** Beneficial effects of Lycium barbarum polysaccharide on spermatogenesis by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in streptozotocin-induced diabetic male mice. *Food and Function*, **2017**; 8(3), 1215-1226.
 147. **Cuasnicú PS, Echeverría FG, Piazza AD, Cameo MS and Blaquier JA.** Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil*, **1984**; 72(2), 467-471.
 148. **Ernesto JI, Muñoz MW, Battistone MA, Vasen G, Martínez-López P, Orta G and Giojalas, L.** CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol*, **2015**; 210(7), 1213-1224.
 149. **Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G.** Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*, **2005**; 35: 1–10.
 150. **Sullivan R, Frenette G, Girouard J.** Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, **2007**; 9: 483–491.
 151. **Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M and Sullivan R.** Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod*, **2008**; 23(8), 1698-1707.

8. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve Ortaöğretim eğitimlerimi Bolu'da tamamladım. 2009 yılında Bolu Atatürk Anadolu Lisesi'nden mezun olarak aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İngilizce) bölümünde eğitim almaya hak kazandım. Üniversite eğitimimim devam ederken Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda staj eğitimi aldım. 2014 yılında Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2015 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi'nde Pedagojik Formasyon Eğitimi aldım. 2015 yılı yaz döneminde Erasmus Programı aracılığıyla İtalya'nın Perugia ilinde Santa Maria della Misericordia Hastanesi Jinekoloji ve Obstetrik Anabilim Dalı'nda staj eğitimi aldım.

9. EKLER

EK-1: Etik Kurul Onayı

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 4

Konu : Kanserler

24.01/2016

BASVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Lycium barbarum (kurt üzümü)'un deneysel diyabet oluşturulmuş erkek sıçanlarda üreme sistemi ve Crisp-1 protein ekspresyonu üzerine etkisi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Yrd.Doç.Dr.Tülin FIRAT
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Gizem İLTER, Yrd. Doç. Dr. Buket KIN TEKÇE, Yrd. Doç. Dr. Fatma PEHLİVAN KARAKAŞ
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyesi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2016/04	Tarih (Date): 13.01.2016
	Yrd.Doç.Dr.Tülin FIRAT'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yonden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Ayşel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Ürol AYAZ (Üye)	Tıbbi Parasitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hâmet COŞKUN (Üye)	Patoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Nerman SENGİL (İmza Üye)	Genel Cerr. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Serhas ÇAKIR (Üye)	Kuruluş hayvan Yetiştiriciliği Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Doç. Dr. Ali Rıza GİZLİ (Üye)	Beyin Cerr. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fehi ULTAŞ (Üye)	Göze Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Yegem YENİER (Üye)	İklimlendirme Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Sendar GÖZÜTÜRK (Üye)	Yaban Hayvan ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Enay KİMAİLİ (Üye)	Uroloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Mustafa SİTİ (Üye)	Genel Cerr. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Uğur TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hk. Fakültesi	
Vet. Hek. Ayhan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Döşey Hayvanları Üyelik ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Ömer BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA Hırd./BOLU	
Av. Çihan KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi)	Avukat	Tekniker Mahallesi Hürriyet cad.No.47/Merkez/BOLU	



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA / YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

07/08/2017

AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Öğrencinin Adı Soyadı: Gizem İLTER AKTAŞ

Numarası: 146209002

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Lisansüstü Eğitim
Düzeyi:

Yüksek Lisans



Doktora



Tez Başlığı: Lycium Barbarum (kurt üzümü) 'un Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Erkek Sıçanlarda Üreme Sistemi ve Crisp-1 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan ...103...sayfalık kısmına ilişkin 06/08/2017 tarihinde tez danışmanımca *Turnitin* intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı "alıntılar hariç" yapıldığında % 9, "alıntılar dahil" yapıldığında ise % 9 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Filtrelemeler:

- 1- Kaynakça Hariç,
- 2- Alıntılar Dahil

"AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulama Esasları" nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Ad Soyad ve İmza
Gizem İLTER AKTAŞ

EK: 1 adet tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde raporlama işlemi bittikten sonra alınmış ekran görüntüsü eklenecektir.

TEZ DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR
07/08/2017

Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT
(Unvan, Ad Soyad, Tarih, İmza)

