

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**DİYABETİK SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA GHRELİN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TSA_11_3657

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr.Mehmet Fatih SÖNMEZ
E.Ü. Tıp Fakültesi / Histoloji ve Embriyoloji AD

Derya AKKUŞ / E.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Ayça KARA / E.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Prof.Dr.Munis DÜNDAR/ E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Prof.Dr.Eser KILIÇ/ E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD

Aralık 2012

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSA-11-3657 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
4. BULGULAR	16
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	22
6. KAYNAKLAR	25

Diyabetik Sıçan Testis Dokusunda Ghrelin Ekspresyonunun Araştırılması

ÖZET

Ghrelin, çeşitli fonksiyonlara sahip, GH salgılatıcı reseptörün (GHS-R) endojen ligandıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ghrelinin üreme organların üzerine fonksiyonlara sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada sıçan testisinde diyabet ile GHS-R1a gen ekspresyonu ve ghrelin arasındaki ilişki araştırıldı.

Bu çalışmada 40 adet erkek Wistar albino sıçan 4 gruba ayrıldı: kontrol, bir, iki ve üç aylık diyabetik sıçanlar. Diyabet STZ (40mg/kg i.p) ile oluşturuldu. Sıçanlar ketamin anestezisi altında dekapite edildi ve testis dokuları çıkarıldı. Serum FSH, LH ve testosteron seviyeleri, doku ghrelin ve GHS-R mRNA seviyeleri ile ghrelin ekspresyonları ve histopatolojik hasar skorları karşılaştırıldı.

Diyabetik sıçanlarda serum FSH seviyesi artarken, LH ve testosteron seviyeleri, seminifer tübül çapları ve testiküler biyopsi skorlarında önemli derecede azalma görüldü. İlk başta kısa süreli diyabetik sıçanlarda ghrelin ve GHS-R1a gen ekspresyonlarında ve ghrelin immünohistomkimya skorlamlarında artış gözlenirken, uzun vadeli diyabetik sıçanlarda azalma gözlemlendi fakat bu fark anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak testis dokusundaki ghrelin ekspresyonu, diyabetik sıçanlarda serum gonodotropin seviyeleri ve düşük enerji düzeyleri ile düzenlenmektedir.

The Investigation of Ghrelin expression on Diabetic Rats' Testes Tissue

ABSTRACT

Ghrelin, the endogenous ligand for the GH secretagogue receptor (GHS-R), has various functions. Recent studies have implicated the peripheral actions of ghrelin in reproductive tissues. In this study we investigated the relationship between diabetes and ghrelin and GHS-R1a gene expression in the testes of rats.

A total of 40 male Wistar albino rats were divided into four groups: control, one, two, and three months diabetic rats. Diabetes was induced STZ (40mg/kg i.p). The rats were decapitated under ketamine anesthesia and their testes tissues were removed. Serum FSH, LH, and testosterone levels, tissue ghrelin and GHS-R mRNA levels, ghrelin expression, and histopathological damage scores were then compared.

The serum FSH levels was increased and the serum LH and testosterone levels, mean seminiferous tubule diameter and mean testicular biopsy score was decreased significantly of the diabetic rats. The ghrelin and GHS-R1a gene expression and ghrelin immunohistochemistry score first increased in short-term diabetic rats, then decreased in long-term diabetic rats; however, these differences were not significant.

In conclusion, ghrelin expression in testis tissue is regulated both serum gonodotropin levels and negatives energy status in diabetic rats.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Diabetes Mellitus dünya nüfusunun yaklaşık %1-2'sini etkileyen ve prevalansı giderek artan bir hastalıktır. Bu sayının 220 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. Diyabetik hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelir. Akut dönemde oluşan metabolik bozukluklar yaşamı tehdit edecek düzeyde hatta ölümcül olabilir. Bugün için asıl sorun uzun sürede oluşan, diyabetin kronik mikro ve makrovasküler komplikasyonlarıdır. Diyabetin vasküler komplikasyonları bütün dünyada en önemli morbidite ve mortalite nedeni olmayı sürdürmektedir. Birçok araştırmacı diyabetin kronik komplikasyonları üzerine yoğun çalışmalar yürütmektedir. Bu komplikasyonlardan biri de infertilite ile sonuçlanan testisler üzerine olmaktadır. Diyabet erektil disfonksiyon, retrograd ejakulasyon, testiküler hormon ve semen kalitesinde azalma ile ilişkilidir. Streptozotosin ile oluşturulan diyabetik sıçanların testis dokusunda apoptozisin arttığı da rapor edilmektedir.

Ghrelin büyüme hormonu salgılanması, iştah, gıda alımı, karbonhidrat metabolizması, gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem, hücre proliferasyonu ve reproduktif sistem üzerine etkileri olan bir hormondur. Ghrelinin reproduktif sistemde direkt etkisinin ne olduğunun sınırları tam olarak bilinmemektedir. Üreme sistemi üzerine olan ekstragonadal etkilerinin olduğu da bildirilmiştir. İn vitro olarak lüteinizan hormon (LH) sekresyonunu suprese ettiği ve gonadotropin releasing hormon (GnRH)'a LH yanıtını azalttığı gösterilmiştir. Özetle lokal veya sistemik olarak enerji dengesini ve üreme sistemi arasındaki dengeyi kurar. Diyabet enerji dengesinin bozulduğu önemli metabolik hastalıklarından biridir. Ghrelinin olası reproduktif etkileri üzerine yanıtsız pek çok soru vardır. Yanıtsız sorulara ışık tutması amacıyla bu çalışmada diyabetik sıçanların testis dokularında ghrelin ekspresyonunun nasıl etkileneceğinin amaçlandı. Bu çalışmada diyabetin testis dokusunda oluşturduğu hasarları belirlemek için öncelikle deney hayvanlarının ağırlıkları, testis ağırlıkları, kan glukoz

düzeyleri ölçüldü. Johnsen tübüler biyopsi skoru ile testis histopatolojisi değerlendirildi. Ayrıca ELİSA yöntemiyle plazma FSH, LH ve Testosteron sevipleri belirlendi. Diyabetin testis dokusundaki ghrelin ekspresyonunu nasıl etkilediğini belirlemek için ise immunohistokimya ve Real Time PCR yöntemi kullanıldı.

GENEL BİLGİLER

Ghrelin temelde serin 3 n-octanoylation içeren 28 amino asitli bir peptiddir (1). Ghrelin büyüme hormonu salgılatan reseptörün (GHS-R) doğal bir ligandıdır. Ghrelin ve GHS-R beyin, böbrek, mide, pankreas ve testis gibi çok çeşitli dokularda eksprese olur (2). Bu molekül aslında insan ve sıçan gibi çeşitli türlerde in vivo ve in vitro çalışmalarda GH sekresyonuna sebep olmasıyla keşfedilmiştir (3, 4). Önceki çalışmalar ghrelinin birçok endokrin ve endokrin olmayan biyolojik sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu biyolojik etkilere, laktotropik, kardiotropik ve gonodotropik ekseninde; metabolik ve kardiovasküler etkiler; gastrik motilite ve asit sekresyonunun düzenlenmesi; pankreatik insülin sekresyonu ve modülasyonu, glukoz metabolizmasının düzenlenmesi ve farklı doku ve tümörlerdeki hücre proliferasyonu dahildir (5, 6).

Önceki çalışmalarda ghrelinin üreme fonksiyonlarının farklı yönlerinin düzenlenmesinde rol alabileceği belirtilmiştir. Dolaşımdaki ghrelinin hipotalamus-hipofiz gonadal ekseninde (HpgA) farklı seviyelerde etkilemektedir, hem gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH), folikül stimüle edici hormonun (FSH) ve lüteinizan hormonun (LH) üretilmesine hemde bunların salgılanmasına katılır (7, 8). Ayrıca ghrelin ve onun işlevsel reseptörünün ovaryum, uterus, prostat ve testis gibi üreme organlarında eksprese olduğu gösterilmiştir (9-11). Bu benzer güçlü ekspresyonun aynı anda birden fazla yerde olması, lokal olarak üretilen ghrelinin farklı dokulardaki parakrin ve otokrin düzenleyici etkilerinin olabileceği anlamına gelir (12).

Streptozotosin (STZ) pankreasın insülin salgılayan hücrelerinde hasar oluşturarak diyabete neden olan bir antibiyotiktir. Streptozosinle indüklenmiş diyabetli sıçanlarda vücut ağırlığında azalma görülmüş ve hiperfaji, hiperglisemi ve hipoinsulinemi ortaya çıkmıştır. Ayrıca STZ ile indüklenmiş diyabetli sıçanlarda plazma ghrelin seviyelerinde ve gastrik preproghrelin mRNA ekspresyon seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (13). Buna rağmen

hiçbir çalışmada STZ ile indüklenmiş insülin bağımlı diyabetli sıçanların testis dokusunda ghrelin ekspresyonu gösterilmemiştir. Bu çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetli sıçanlarda ghrelin ve ghrelin reseptör düzenlenmesi arasındaki ilişki ELİSA, RT-PCR ve immünohistokimyasal tekniklerle araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yetiştirilen ergin erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde iyi havalandırılmış bir ortamda tutulan sıçanlar doğal fotoperiyotlarında 12 saat aydınlık –karanlık döngüye maruz bırakılarak istenildiği kadar yem ve suya erişimlerine izin verildi. Bütün hayvanlar, Ulusal Bilim Akademisi tarafından hazırlanan ve Sağlık Ulusal Enstitüsü tarafından yayımlanan 'Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Kılavuzu'nda' belirtilen kriterlere göre yetiştirildi. Yerel etik kuruldan deney hayvanları kullanımı için etik kurul raporu alındı ve etik düzenlemeler deneyler sırasında hayvan refahının korunması için ulusal ve kurumsal kurallara uygun olarak takip edildi (Public Health Service (PHS), 1996). Sıçanlar her grupta on sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I: kontrol grubu;

Grup 2: bir aylık diyabetik sıçanlar;

Grup 3: iki aylık diyabetik sıçanlar;

Grup 4: üç aylık diyabetik sıçanlar.

Sıçanlarda diyabet, hayvanlar bir gece aç bırakıldıktan sonra intraperitoneal STZ (40 mg/kg) enjeksiyonuyla (n=30) oluşturuldu; kontrol grubuna ise fizyolojik serum (n=10) enjekte edildi. Hiperglisemi, STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra, kuyruk damarından glukometre ile kan glikoz düzeyleri ölçülerek onaylandı. Hayvanlar ortalama plazma glikoz seviyeleri 250 mg/dl'nin üzerinde ise diyabetik kabul edildi. Glisemi STZ enjeksiyonundan sonra 4, 8 ve 12. haftalarda hayvanlar öldürülmeden önce tekrar teyit edildi.

Deney süresi sonunda hayvanlar intraperitoneal ketamin (75 mg / kg) + ksilazin (10 mg / kg) anestezi altında dekapite edilerek öldürüldü. Dekapitasyondan sonra testis dokuları hızla

çıkarıldı. Testis dokularının bazıları RT-PCR analizi için kullanıldı ve diğer dokular içinde histolojik prosedürler uygulandı.

Serum Testesteron Seviyeleri

Serum testesteron düzeyi kit üretici tarafından verilen standart protokole göre ELİSA yöntemi ile CUSABIO Sıçan Testosteron (T) Elisa kiti (ELISA CSB-E05100r, 96 Wells kit, CUSABIO Bıotech CO., LTD, Whuan, Hubei, P.R.China) kullanılarak ölçüldü. Kitin duyarlılığı 0,06-25,6 ng / ml idi.

Serum FSH Seviyeleri

Serum FSH düzeyi kit üretici tarafından verilen standart protokole göre ELİSA yöntemi ile CUSABIO Sıçan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) Elisa kiti (ELISA CSB-E06869r, 96 Wells kit, CUSABIO Bıotech CO., LTD, Whuan, Hubei, P.R.China) kullanılarak ölçüldü. Kitin duyarlılığı 0.4mIU/ml–100mIU/ml idi.

Serum LH Seviyeleri

Serum LH düzeyi kit üretici tarafından verilen standart protokole göre ELİSA yöntemi ile CUSABIO Sıçan Luteinizan Hormon (LH) Elisa kiti (ELISA CSB-E12654r, 96 Wells kit, CUSABIO Bıotech CO., LTD, Whuan, Hubei, P.R.China) kullanılarak ölçüldü. Kitin duyarlılığı 0.15mIU/ml–60mIU/ml idi.

Histopatolojik Değerlendirme

Testiküler dokular bir histolog tarafından standart ışık mikroskopunda rastgele seçilerek değerlendirildi. Ortalama seminifer tübül çapı (MSTD) mikrometre ile ölçüldü (Analiz LS Araştırma Programı). Testis dokusundaki hisopatolojik değerlendirme için daha önce Jhonsen (14) tarafından tanımlanmış olan ortalama testis biyopsi skoru (MTBS) kullanıldı (Tablo 1). Testis başına 20 den fazla seminifer tübül değerlendirildi. Bu sistemdeki sınıflandırmada testiküler dokunun seçilen her bölümündeki bütün tübüllerin her biri sistematik olarak 1 ila 10

arasında skorlanarak değerlendirilmektedir. Spermatogenez skorunun tamamı çok sayıda spermatozoa varken 10 olarak değerlendirilir.

Tablo 1: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması (MTBS).

Skor	Histolojik Bulgular	Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüler kesitte hiçbir hücre yoktur.	6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur.
2	Sadece sertoli hücreleri vardır.	7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.	8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatosit vardır.	9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır.
5	Fazla sayıda spermatosit mevcuttur.	10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur.

İmmünohistokimya

Ghrelin ekspresyonu testislerde tavşan polikolanal antikoru (sc.50297 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) kullanılarak streptavidin-biotin tekniğiyle immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Prosedür bütün kesitler için aynı koşullar altında uygulandı. Parafin kesitler (5 µm) ksilen ile deparafinize edildi. Kesitler deiyonize su ile rehidrate edildi ve antijen kazanımı için 95 °C’de 0.01 M sodyum sitrat buffer ile 5 dakika muamele edildikten sonra hızlı bir şekilde oda sıcaklığına alınarak 20 dakika boyunca soğutuldu. Sonra kesitler fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 10 dakika boyunca metanol içinde 1% H₂O₂ inhibe edildi. Kesitler daha sonra %5’lik serum blokajı ile nonspesifik boyanmayı engellemek için muamele edildi. Histolojik kesitler 4 °C’de gece boyunca %5’lik serum blok ile dilüe edilen 5µg/ml poliklonal ghrelin antikoru ile inkübe edildi. Daha sonra kesitler PBS ile yıkandı ve biyotinli sekonder antikor ile inkübe edildi. Sonra immünreaksiyon streptavidin-avidin-biotin kompleksi ile güçlendirildi ve kesitler 3,3

P-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) ile muamele edildi ve hematoksilinle zıt boyama yapıldı. En az altı kesitin her birinin on farklı alanı görüntülendi. Pozitif ve negatif kontrollerde incelendi.

Real Time PCR Reaksiyonu (RT-PCR)

Total RNA 20-30 mg testis dokusundan üreticinin protokolü izlenerek MO Bio kit (MO Bio, Solana Beach, CA, USA cat.:15000-50) kullanılarak izole edildi. Ters transkripsiyon, heksamer ve oligo-dT primerler ve Transkriptör High Fidelity Reverse Transcriptase (Roche, REF: 05081955001; Version 6.0) üreticinin protokolüne göre kullanılarak gerçekleştirildi (reaksiyon başına 1µg izole edildi). Elde edilen cDNA LightCycler® 480 Probes Master (Roche, REF: 04707494001; Version 09) kullanılarak kantitatif RT-PCR reaksiyonuna tabi tutuldu ve ghrelin, ghrelin reseptörü ve housekeeping genler Universal ProbeLibrary Probes (Roche, Applied Sciences, Mannheim, Germany) ile belirlendi (Tablo 2). URL problemleri 5' ucundan flouresan (FAM) ile 3' ucundan ise dark quencher boyası ile etiketlendi. UPL testleri flouresan (FAM) veya SYBR gren 1'i tespit edebilen tüm RT-PCR cihazları ile uyumlu idi. Ghrelin ve ghrelin reseptörü için problemler FAM boyası ile işaretlendi. Sıçanların gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) çoğaltılmasında, incelenen RNA örneklerinin endojen normalleştirilmesi ve kalitesi için housekeeping/ referans gen olarak kullanıldı. GAPDH FAM ile işaretlendi böylece ghrelin ve GHSR'nin aynı reaksiyon içinde çoğaltıldığı kabul edildi. Reaksiyon 45 siklusa LightCycler® 480 II (Roche) üzerinde yürütüldü ve reaksiyon sonuçları Efficiency corrected Advanced Relative Quantification algorithm on LightCycler® 480 SW 1.5 software ile analiz edildi. Reaksiyon şartları şöyleydi: 5 dakika 95 C'de denatürasyon, 50 C'de 15 dakika primerlerin bağlanması, 72 C'de 10 dakika uzama. bütün örnekler iki kez test edildi.

Tablo 2. Primer sekansları ve qRT-PCR için kullanılan UPL problemlerinin ID numarası.

Organizma	Gen Sembolü	Gen Açıklaması	ID Testi	Primer Yönlendirmesi	Sekans	Reverse Sekansı	Primer	UPL Prob No
R. norvegicus	GapdH	gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	502303	AAAGCTGTGGC GTGATGG		TTCAGCTCTGGG ATGACCTT		26
R. norvegicus	Ghrl	Açlık düzenleyici hormon Prekürsörü (büyüme hormonu salgılatıcı)	503935	GGAGGAGCTGG AAATCAGGT		GCTGGTACTGA GCTCCTGACA		148
R. norvegicus	Ghsr	Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör Tip 1 (GHS-R)	503831	CCAGAACCACA AGCAGACAG		CGAAGGACTTG GAAAAGAGGT		71

İstatistiksel Analiz

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi gruplar arasındaki farkı belirlemek için kullanıldı. Sonuçlar $\pm$ SE olarak sunulmuştur. $p < 0.005$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SPSS / PC programı (Sürüm 15.0; SPSS, Chicago, IL) istatistiksel analiz için kullanıldı.

BULGULAR

STZ ile muamele edilmiş 4, 8 ve 12 haftalık periyotlardaki sıçanların nihai kan glikoz düzeyleri kontrol grubuna göre oldukça yüksek tespit edildi (Tablo 3; $P < 0.001$). Başlangıçtaki vücut ve testis ağırlığı tüm gruplarda benzerdi. Fakat iki ve üç haftalık diyabetik sıçanlarda son vücut ve testis ağırlığında kontrol grubuna göre önemli derecede azalma gözlemlendi (Tablo 3; $P < 0.05$).

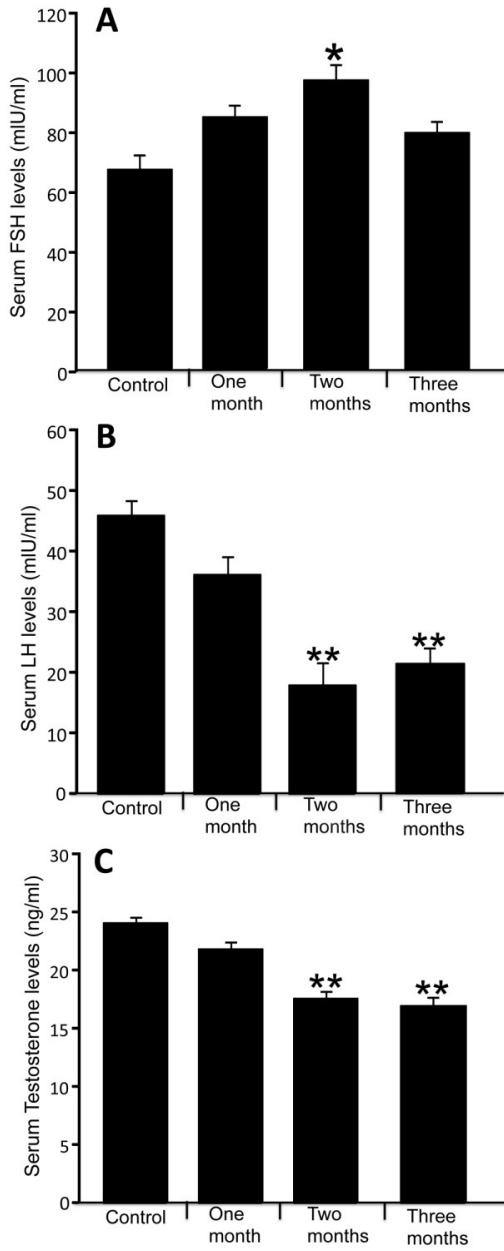
Tablo 3: Kontrol ve streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik sıçanların kan glukoz düzeyleri, vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları.

	Vücut Ağırlığı (g)	Testis Ağırlığı (mg)	Serum Glikoz (mg/dl)
Kontrol	286.1 ± 13.6	1.34 ± 0.23	106.10 ± 2.51
Bir Aylık	269.9 ± 8.6	1.18 ± 0.37	485.90 ± 36.07*
İki Aylık	169.6 ± 15.5*	0.85 ± 0.73*	509.10 ± 32.86*
Üç Aylık	203.2 ± 13.7*	0.98 ± 0.62*	453.71 ± 30.61*

Değerler ortalama olarak ifade edilir ± SE. * $P < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ** $P < 0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

Serum Hormon Bulguları

Serum FSH, LH ve testesteron seviyelerindeki değişiklikler Şekil 1’de gösterilmiştir. Diyabetik sıçanların serum FSH seviyeleri kontrol sıçanlara göre daha yüksek bulundu. İki aylık diyabetik sıçanların serum FSH seviyeleri kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek iken; bir ve üç aylık diyabetik sıçanların serum FSH seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir farklılık göstermedi. Serum LH düzeyleri iki ve üç aylık diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldı. Serum testosteron seviyeleri de iki ve üç aylık diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma gösterdi.



Şekil 1: Kontrol ve streptozozosin (STZ) indüklenmiş diyabetik sıçanlarda serum FSH, LH ve Testosteron seviyeleri. *P < 0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, **P < 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubu testis dokuları normal testiküler yapıdaydı ve düzenli seminifer tübül morfolojisi ile normal spermatogenezis ve primer ve sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoa varlığı gösterdi. Her grubun testisleri için MSTD ve Johnsen'in MTBS değerleri

Tablo 4’de gösterildi. STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların testis dokularının MTBS ve MStTD değerlerinin kontrol grubunun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu gözlemlendi. Sıçanlar daha uzun süreli diyabet olduğunda MSTD ve MTBS değerleri daha da düşüktür.

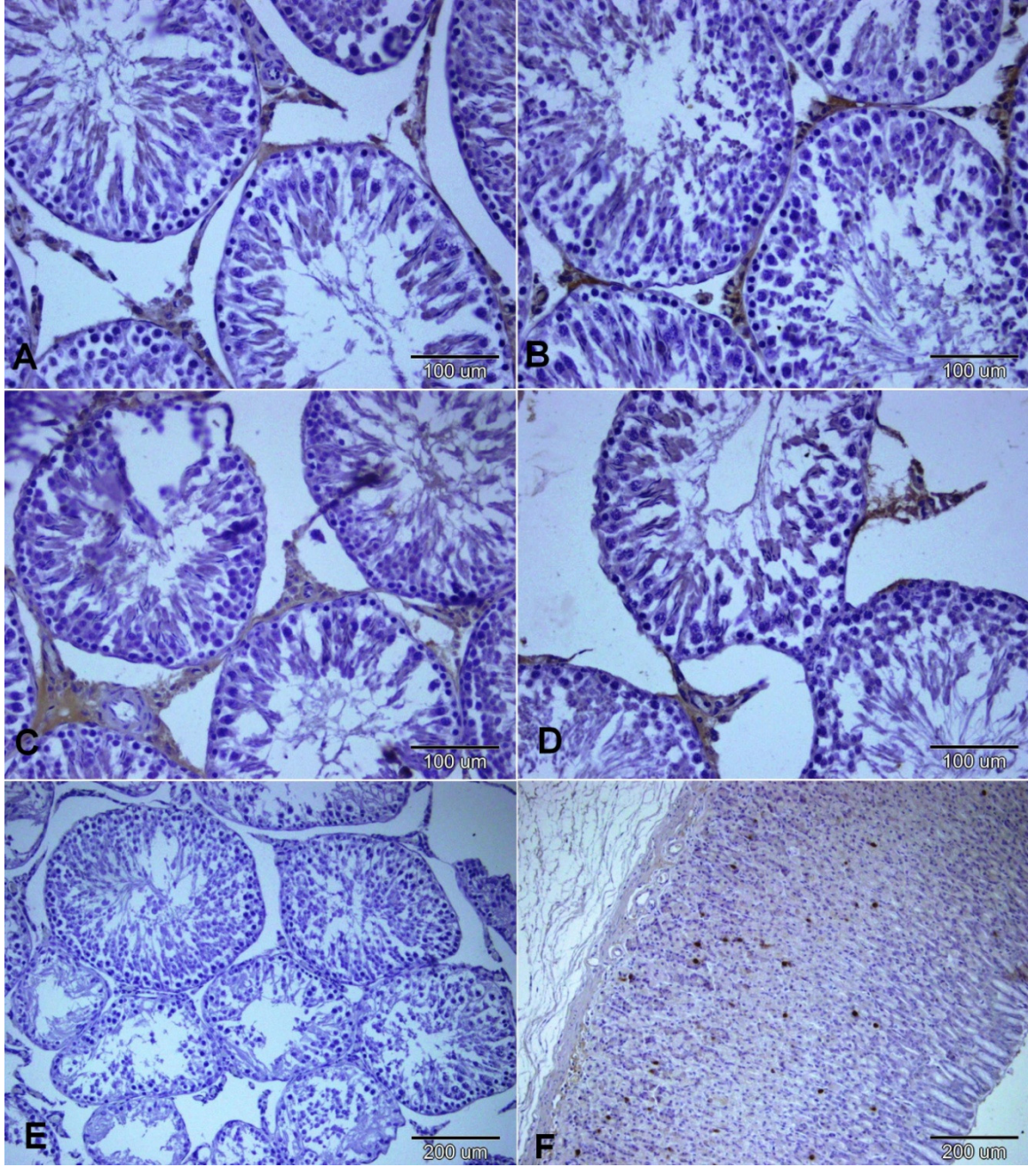
Tablo 4: Kontrol ve streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik sıçanların seminifer tübül çapı ortalamaları (MSTD) ve testiküler biyopsi skoru ortalamaları.

	MTBS	MSTD (µm)
Kontrol	9.46±0.07	387.36±6.25
Bir Aylık	8.21±0.33*	323.79±6.65**
İki Aylık	6.83±0.37**	287.12±9.84**
Üç Aylık	5.58±0.44**	268.20±11.67**

Değerler ortalama olarak ifade edilir $\pm$ SE. *P < 0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, **P < 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

İmmünohistokimyasal Bulgular

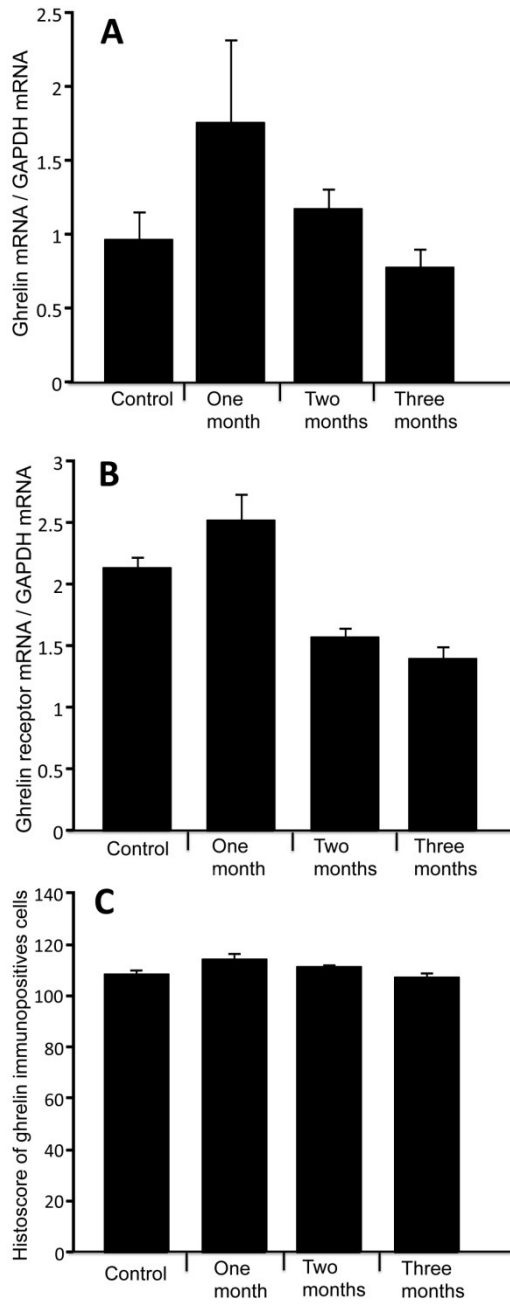
Her grubun testis dokuları için ghrelin proteinin hücresel ekspresyon özellikleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Ghrelin immün boyanması tüm gruplarda Leydig hücrelerinde tespit edildi (Şekil 2). Testislerde test edilen ghrelin için boyanma yüzdesi Image-J software programı kullanılarak ölçüldü. Ghrelin ekspresyonunun boyanma yüzdesi $\pm$ SE) tüm gruplarda benzer bulundu (Şekil 3).



Şekil 2. Diyabetin testisteki ghrelin ekspresyonuna etkileri **(A)** Kontrol **(B)** Bir aylık diyabet **(C)** İki aylık diyabet; **(D)** Üç aylık diyabet **(E)** Negatif kontrol (Üç aylık diyabet) **(F)** Pozitif kontrol: mide dokusundaki ghrelin immunopozitif hücreler. Ghrelin ekspresyonunun tüm gruplarda benzer olduğu gözlemlendi. Kesitler immünperoksidazla boyandı.

RT-PCR Bulguları

Testislerde ghrelin ve ghrelin reseptörü mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR kullanılarak ölçüldü. Bir aylık diyabetik sıçanlarda GHS-R ve ghrelin yüksek seviyelerde gözlenirken bunu takiben iki ve üç aylık diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. Farklı gruplarda bu genlerin ekspresyon seviyeleri farklı olmasına rağmen bu fark anlamlı bulunmadı (Şekil 3).



Şekil 3: Kontrol grubu ve streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik sıçanların testis dokularında ghrelin-immünpozitif hücrelerin histoskorlaması ve ghrelin mRNA ve ghrelin reseptörünün mRNA ekspresyon seviyeleri.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Giderek artan kanıtlar üreme fonksiyonları ve enerji kontrol mekanizmaları arasındaki yakın ilişkiyi göstermektedir (15). Ghrelin ekspresyonu insan ve sıçanların olgun Leydig hücrelerinde gösterilebilmiştir. Bu nedenle fonksiyonel ghrelin reseptörünün (GHS-R tip 1a) ekspresyonu Sertoli ve Leydig hücrelerinde ortaya konmuştur (9,16) . Diğer taraftan seminifer tübüllerde GHS-R1a ‘nın güçlü ekspresyonu, seminifer epitelin ghrelin etkinliği için hedef olabileceğini ve doğrudan seminifer tübül fonksiyonları ile düzenlendiğini düşündürmektedir (16). Bununla beraber ghrelinin gonadal fizyolojiyi, beyin ve hipofizden salınan üreme faktörlerinin sentezi ve salınımını etkileyerek üremeyi düzenlediği düşünülmektedir (17). Ghrelinin 10 gün boyunca günlük subkutan enjeksiyonu germinal epitel kalınlığı, seminifer tübül çapı ve spermatogonial olmayan hücrelerde azalmaya neden olmuştur (18). Bu ghrelinin testiste inhibitör etkisi olduğunu düşündürmektedir. Ghrelin intratestiküler enjeksiyonu Leydig hücrelerinin proliferatif etkinliğini inhibe etmiştir. Ayrıca ghrelinin sıçanlarda in vivo ve in vitro Leydig hücre gelişimi ve spermatogenesizin önemli bir düzenleyicisi olan kök hücre faktörünün ekspresyonunun inhibe ettiği bildirilmiştir (11). Bu sonuçlara dayanarak açık bir şekilde ghrelin üremenin düzenlenmesinde gonadal steroidogenesis, gonadal morfoloji ve gonadal faktörleri ayarlamaktadır (19). Bu çalışmada testislerde ghrelin ve ghrelin reseptörünün ekspresyonu belirlendi. Ghrelinin Leydig hücrelerindeki orta derecede ekspresyonu immünohistokimyasal olarak gözlendi. Ghrelin ekspresyonunun yalnızca Leydig hücrelerinde görülmesi önceki çalışmalarla uyumludur.

Diyabetik durumun deney hayvanlarında erkek üreme aktivitesini baskıladığı ve infertilitenin erkek diyabetik sıçanlarda sık görülen bir komplikasyon olduğu kabul edilmektedir. Diyabet testiküler ağırlıkta, sperm sayısında ve hareketliliğinde, testosteron seviyesinde azalmaya ve sıklıkla anormal spermatogenesize neden olmaktadır (20, 21). Ghrelinin plazma seviyesi enerji dengesinin düzenlenmesinde rol alan beslenme durumundan

etkilenir. Üremenin hormonal düzenlenmesi multifaktöriyeldir ve üreme başarısı enerji durumuna bağlıdır. Bir orexigen olan ghrelinin enerji kazancında önemli bir pozitif rolü olduğu kanıtlanmıştır. Enerji durumu üreme kapasitesinin belirlenmesinde kritik bir faktördür. Biz literatür taramamızda testiste grelin ekspresyonuna diyabetin etkisine bakan herhangi bir çalışma bulamadık. Biz diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda testiste ghrelinin ekspresyonunu çalışmaya karar verdik çünkü diyabette enerji dengesi bozulmuştur ve ghrelinin enerji dengesine katıldığı ve üreme sistemlerine eksprese edildiği bulunmuştur.

STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlar hayvan çalışmalarında kullanılan klasik diyabet modelidir. STZ ile muamele edilmiş sıçanlarda vücut ağırlığı ve serum insülin düzeyleri azalırken kan glikoz düzeyleri önemli derecede artmaktadır. Bu bulgular çalışmamızda STZ enjeksiyonuyla diabetes mellitus indüklenmesinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Ghrelinin serum ve doku seviyeleri üzerine diyabetin etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur. STZ ile muamele edilmiş sıçanlarda serum ghrelin seviyeleri önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bununla beraber diyabetik sıçanlarda farklı dokulardaki ghrelin seviyeleri farklıdır. Masaoka ve arkadaşları diyabetik sıçanların midelerindeki propoghrelin mRNA seviyelerinde artış gözlemlerken duodenum ve kolonda bir farklılık tespit etmemişlerdir (13). Ishii ve arkadaşları diyabetik sıçanların midelerindeki ghrelin seviyesinde önemli bir artış olmadığını belirtmişlerdir (22). Biz bu çalışmada ghrelin ve GHS-R1a gen ekspresyonunda ve immünohistokimya skorlamasında ilk önce kısa süreli diyabetik sıçanlarda artış gözlerken uzun süreli diyabetik sıçanlarda azalma gözlemledik ancak bu fark anlamlı değildi. Birçok çalışmada gösterildiği gibi ghrelin seviyeleri üzerine diyabetin etkisi çeşitli dokularda farklılık göstermektedir.

Çeşitli çalışmalarda ghrelin fonksiyonunun hedefi olarak HPG eksenine dikkat çekilmiştir. Ancak ghrelin ve gonodotropin seviyeleri konusunda çelişkili veriler bulunmaktadır. Örneğin ghrelinin intracerebroventiküler uygulanması dişi sıçanların

sikluslarındaki LH sekresyonunun önemli derecede inhibe edilmesine yol açar (15). Benzer şekilde ergenlik döneminde ghrelinin günlük enjeksiyonu LH seviyelerinde düşüşe neden olmuştur (23). Diğer bir çalışmada gıda-kısıtlı erkek sıçanlarda ghrelin enjeksiyonunun tekrarı plazma LH ve T konsantrasyonlarında önemli derecede azlamaya ve testis ağırlıklarında düşüşe neden olmuştur (24). Duran ve arkadaşları idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm (İHH) hastalarında serum LH ve testosteron seviyeleri düşük olanlarda serum ghrelin düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir ve İHH'li hastalardaki düşük ghrelin seviyelerinin gonodotropinlerin düşük seviyesinden kaynaklanabileceğini önermişlerdir (25). İlhan ve arkadaşları serum testosteron seviyeleri arttığında serum ghrelin seviyelerinin de önemli derecede arttığını göstermişlerdir (26). Ishikawa ve arkadaşları Leydig hücrelerindeki ghrelin ekspresyonu ile serum testosteron konsantrasyonlarının ters orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca ghrelinin direkt spermatogenezle ilişkili olmadığını önermişlerdir (27). Bu çalışmada ghrelin seviyelerinin diyabetik sıçanların testis dokularında önemli derecede değişmediği ve düşük testosteron ve LH seviyelerinin diyabetten kaynaklandığı bulundu.

Bizim çalışmamızda diyabet ve kontrol grubu sıçan testislerinde ghrelin ve GHS-R1a gen ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. Hem serum gonodotropin seviyesi hem de negatif enerji dengesi, testisteki ghrelin seviyesinin etkisiyle muhtemelen diyabet yoluyla etkilenmektedir. Bir aylık diyabetik sıçanlardaki yüksek ghrelin seviyesi muhtemelen diyabet nedeniyle ortaya çıkan negatif enerji dengesinden kaynaklanmaktadır, bununla birlikte iki ve üç aylık diyabetik sıçanlardaki ghrelin seviyesinin sonradan düşüşü muhtemelen testislerdeki ghrelin ekspresyonu üzerinde, düşük serum gonodotropin seviyelerinin güçlü düzenleyici etkisi nedeniyle ortaya çıkmaktadır.

Kaynaklar

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-60.
2. Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, et al. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2335-40.
3. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(3):1169-74.
4. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000;407(6806):908-13.
5. Broglio F, Arvat E, Benso A, Papotti M, Muccioli G, Deghenghi R, et al. Ghrelin: endocrine and non-endocrine actions. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002;15 Suppl 5:1219-27.
6. Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. The potential autocrine/paracrine roles of ghrelin and its receptor in hormone-dependent cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(2):113-22.
7. Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett*. 2004;362(2):103-7.
8. Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, Morroni M, Baragli A, Castellucci M, et al. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(2):137-52.

9. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002;143(2):717-25.
10. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, et al. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(1):400-9.
11. Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, et al. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology*. 2004;145(11):4825-34.
12. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res*. 2009;41(11):814-21.
13. Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, et al. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett*. 2003;541(1-3):64-8.
14. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2-25.
15. Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, et al. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology*. 2005;82(5-6):245-55.
16. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol*. 2004;226(1-2):1-9.

17. Tena-Sempere M. Ghrelin as a pleiotrophic modulator of gonadal function and reproduction. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(12):666-74.
18. Kheradmand A, Roshangar L, Taati M. The role of ghrelin on the morphometry and intracellular changes in the rat testis. *Tissue Cell.* 2009;41(2):105-11.
19. Unniappan S. Ghrelin: an emerging player in the regulation of reproduction in non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 2010;167(3):340-3.
20. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci.* 2007;81(13):1079-84.
21. Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia.* 2009;41(6):361-8.
22. Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology.* 2002;143(12):4934-7.
23. Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, et al. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology.* 2006;147(5):2374-82.
24. Sirotkin AV, Chrenkova M, Nitrayova S, Patras P, Darlak K, Valenzuela F, et al. Effects of chronic food restriction and treatments with leptin or ghrelin on different reproductive parameters of male rats. *Peptides.* 2008;29(8):1362-8.
25. Duran C, Yonem A, Ustun I, Ozcan O, Ipcioglu OM, Basekim CC. Plasma ghrelin levels in males with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrine.* 2008;34(1-3):81-6.
26. Ilhan T, Erdost H. Effects of capsaicin on testis ghrelin expression in mice. *Biotech Histochem.* 2013;88(1):10-8.
27. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M. Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. *J Androl.* 2007;28(2):320-4.