T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

DİYABETİN SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA OLUŞTURDUĞU HASAR ÜZERİNE PENTOKSİFİLİN'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No:TDA-2014-4453

Dış Kaynaklı ACİP

SONUÇ RAPORU

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

Prof.Dr.Eser KILIÇ / E.Ü. Tıp Fakültesi / Biyokimya AD

Prof.Dr.Munis Dündar / E.Ü. Tıp Fakültesi / Tıbbi Genetik AD

Ocak 2015

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDA-2014-4453 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
ÖZET	**6**
ABSTRACT	**7**
GİRİŞ	**8**
GENEL BİLGİLER	**8**
Diabetes Mellitus	**8**
Oksidan Sistem ve Etkileri	**9**
Diyabet ve oksidatif sistem	**10**
Diyabet ve testis hasarı	**10**
Pentoksifilinin diyabet tedavisindeki önemi	**11**
GEREÇ VE YÖNTEM	**11**
Doku takibi	**12**
İmmunohistokimya	**13**
Apoptozis(Tunel)	**14**
Elisa	**14**
Biyokimyasal Analizler	**14**
Malondialdehid (MDA) Seviyesi Tayini	**15**
Ksantin oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini	**15**
Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) Seviyesi Tayini	**15**
Tiyol Seviyesi Tayini	**16**
RT-PCR ile gen ekspresyonlarının incelenmesi doğrulanması	**17**
Western Blot	**18**
SDS, Western blot; nNOS, eNOS ve iNOS proteinlerinin Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	**18**
SDS-PAGE'te elde edilen nNOS, eNOS ve iNOS proteinlerine ait bandların Western blotting yöntemiyle	**18**
BULGULAR	**19**
Histolojik bulgular	**20**
İmmunohistokimya bulguları	**21**
Apoptozis (Tunel) Sonuçları	**23**

Elisa Bulguları **24**
Biyokimya bulguları **25**
RT-PCR bulguları **25**
Western blot bulguları **26**
TARTIŞMA VE SONUÇ **27**
KAYNAKLAR **31**

Diyabetin Sıçan Testis Dokusunda Oluşturduğu Hasar Üzerine Pentoksifilin'in Etkilerinin Araştırılması

Özet

Diyabetes Mellitus (DM) dünya nüfusunun yaklaşık %1-2'sini etkileyen ve prevalansı giderek artan bir hastalıktır. Diyabet, erektil disfonksiyon, retrograt ejakulasyon, testiküler hormon ve semen kalitesinde azalma ile ilişkilidir. Diyabetin testis hasarı üzerine olan etkisi multifaktöriyeldir ve tam anlamıyla açıklanamamıştır. Bu projede moleküler düzeyde NOS'ların diyabetin testis fizyopatolojisindeki rolününün ve pentoksifilinin bu hasar üzerine iyileştirici etkisinin araştırılması amaçlandı.

Projede her bir grupta 10 adet olmak üzere toplam 50 adet wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar rastgele 5 gruba ayrıldı; Grup I kontrol; grup II sadece diyabet; grup III ve IV diyabet + pentoksifilin; grup V sadece pentoksifilin. Deneklere diyabet oluşturulması için 40mg/kg intraperitoneal streptozotosin uygulandı ve uygulamadan 72 saat sonra kan glukoz düzeyleri 250mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Grup III sıçanlara deneyin başlangıcından itibaren pentoksifilin, Grup IV sıçanlara ise ilk bir ay serum fizyolojik sonraki bir ay boyunca 50mg/kg pentoksifilin uygulandı.

Deney sonunda Grup II deneklerin MTSD ve JTBS değerleri, serum LH ve testosteron düzeylerinin kontrole göre azaldığı; apoptotik hücre sayısının, MDA, AOPP ve ksantin oksidaz değerlerinin ve NOS1, NOS2 ve NOS3 protein ve mRNA düzeylerinin ise kontrole göre arttığı belirlendi. Tedavi amaçlı verilen penroksifilinin ise bu parametrelerin bir bölümünü düzelttiği bir diğer bölümünü ise iyileştirmediği tespit edildi.

Sonuç olarak kronik bir hastalık olan diyabet testis dokusunda hem histolojik hem de biyokimyasal olarak ciddi hasarlara neden olmaktadır. NOS'lar bu hasarlara aracılık etmektedir ve pentoksifilin bu hasarı kısmen iyileştirmektedir.

Anahtar Kelimeler; Diyabetes Mellitus, Testis, NOS, Pentoksifilin, Sıçan

Investigation Of Effects Of Pentoksifilin On Rat Testicular Tissue Damages Created By The Diabetes

Abstract

Diabetes Mellitus (DM) affects approximately 1-2% of the population and its prevalence getting increase in every year. Diabetes is known to be associated with erectile dysfunction, retrograde ejaculation, testicular hormone level and a decrease in semen quality respectively. The effect of diabetes on testicular damage is multifactoraly and unfortunately it has not been yet understood totally. In this project, we aimed to investigate at the molecular level, the effect of NOS on testes pathology in diabetes and look at the healing effect Pentoxifylline on this damage.

In this project, a group of 10, for a total of 50 wistar albino male rats were used. The rats were randomly divided into 5 groups; Group I control; Group II only diabetes; Group III and IV diabetes + Pentoxifylline; Group V only Pentoxifylline. Subjects underwent 40 mg/kg intraperitoneal streptozotosin for the creation of diabetes and 72 hours after application blood glucose levels 250 mg/dl found were considered as diabetic rats. Group III rats were received just Pentoxifylline from the beginning of experiments, however, Group IV rats were received saline in the first month and 50 mg/kg of Pentoxifylline were received for the fallowing month.

At the end of the experiments, MTSD, JTBS values and serum LH and testosterone levels were decreased in compared to control; however, the number of apoptotic cells, MDA, AOPP, xanthine oxidase activity, NOS1, NOS2 and NOS3 mRNA and protein levels were all increased in compared to the control values. It was detected that a portion of these parameters were getting better and some portion of were not affected with this given Pentoxifylline as therapeutic purposes.

As a result, diabetes which is known as a chronic disease causes serious damages in the testicular tissue both the biochemical and histological ways. NOS take some role to make this damage and Pentoxifylline, take partly a role to make this damage disappear, i.e. get better.

Keywords: Diabetes Mellitus, Testes, NOS, Pentoxifylline, Rat.

1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM) dünya nüfusunun yaklaşık %1-2'sini etkileyen ve prevalansı giderek artan bir hastalıktır. Bu sayının 220 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde ise 3 milyon civarında diyabet hastası 3 milyon civarında da diyabet hastası olmaya potansiyel aday bulunmaktadır. Diyabetik hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Akut dönemde oluşan metabolik bozukluklar yaşamı tehdit edecek düzeyde hatta ölümcül olabilmektedir. 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. Diyabette oluşan hiperglisemi mitokondiriyal elektron transferini ve aktivasyonunu bozarak ve Polyol yolu ile serbest oksijen ürünlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olmaktadır. ROS, nitrik oksit ürünleri (NOS) ile birlikte aynı zamanda membran bileşenleri olan protein, lipit ve karbonhidrat gibi bazı intrasellüler bileşikleri değiştirmektedir. Bu nedenle diyabetin kronik komplikasyonları üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu komplikasyonlardan biri de infertilite ile sonuçlanan testisler üzerine olmaktadır. Diyabet, erektil disfonksiyon, retrograt ejakulasyon, testiküler hormon ve semen kalitesinde azalma ile ilişkilidir.

Diyabetin testis hasarı üzerine olan etkisi multifaktöriyeldir ve tam anlamıyla açıklanamamıştır. Testis üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır, ancak hem oluşan hasarın moleküler mekanizmalarını hem de tedavi seçeneklerini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bundan dolayı bu projede moleküler düzeyde NOS'ların diyabetin testis fizyopatolojisindeki rolününün araştırılması ve pentoksifilin tedavisinin bu hasar üzerine herhangi bir iyileştirici etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diyabetes Mellitus

Diyabetes Mellitus dünya nüfusunun yaklaşık %1-2'sini etkileyen ve prevalansı giderek artan bir hastalıktır. Bu sayının 220 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi tarafından T.C. Sağlık Bakanlığı'nın sahada lojistik işbirliği ile gerçekleştirilen 'Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması)'nın sonuçlarına göre Türk erişkin toplumunda diyabet sıklığının %13.7'ye ulaştığı görülmüştür. Sonuç olarak 1998'de yapılan

TURDEP-I'e göre, yeni tamamlanan TURDEP-II çalışmasında Türkiye'de 12 yılda diyabet sıklığı %90, obezite sıklığı ise %44 artmıştır. Bu nedenle günümüzün en önemli problemlerinden biridir. 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. Diyabetli hastalarda açlık plazma glukoz düzeyi ile kardiyovasküler morbidite ve mortalite arasında sıkı bir ilişki vardır. Diyabette endotelyal fonksiyonun bozulması hem makrovasküler (ateroskleroz, artmış miyokardiyal infarkt ve stroke riski) hem de mikrovasküler (nöropati, retinopati, nefropati ve erektil disfonksiyon) rahatsızlıklarının gelişmesine neden olur.

2.2 Oksidan sistem ve etkileri

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin (ROS) ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogenezinde rol aldığını göstermektedir. Kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım gibi solunum sistemi hastalıkları, diyabetes mellitus, romatoid artrit, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (ENGIN, 2000; ENGIN, 2003; ENGIN, 2005; HASANOGLU, 1994; OZENIRLER, 1994; YARDIM-AKAYDIN, 2004; YARDIM-AKAYDIN, 2006). Diyabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (PİTKANEN, 1992). Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (VAN DAM, 1995; BUKAN, 2003). ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar '*antioksidan savunma sistemleri'* olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve

sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (HALLIWELL, 1995).

2.3 Diyabet ve oksidatif sistem

Diyabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur (BAYNES, 1991). Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı (BAYNES, 1999) ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (ALTAN, 1994; ALTAN, 1994; SAXENA, 1993; ELMALI, 2004; KILIC, 1988). Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diyabet üzerine yapılan birçok çalışmada oksidatif stresin birçok dokudaki hasardan sorumlu olduğu ortaya konmuştur.

2.4 Diyabet ve testis hasarı

Diyabet kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati ve nöropati gibi çeşitli hastalıkların riskini artırdığı gibi aynı zamanda kadınlarda bozulmuş folikülogenezis, anovulasyon, spontan düşük erkeklerde ise testis ağırlığında azalma, testiküler disfonksiyon, impotans, azalmış fertilite, sperm motilite ve konsantrasyonunda azalma ve steriodogenezisde bozulma ile kendini gösteren bir takım reproduktif problemlere de neden olmaktadır (SEXTON, 1997; BAKER, 1998; SAİNİO-POLLANEN, 1997; MEYER, 2000). Apoptozis programlı hücre ölümüdür. Apoptozis testiste normal spermatogenezi kontrol etmektedir. Diyabetle ilişkili apoptozis'in mekanizması net olarak açık olmamakla birlikte diyabetin apoptozisi artırdığı rapor edilmektedir (CAI, 1997; COLLİN, 1996; CAİ, 2000). Testideki kan akımının zayıf olması bu dokudaki kan basıncının düşük olması anlamına gelir. Bu nedenle spermatogenezis ve Leydig hücrelerinin yürüttüğü steriodogenezis düşük oksijen basıncından dolayı oksidatif strese duyarlıdır. Testis dokusu aynı zamanda serbest radikal hasarından kendini korumak için çok önemli mekanizmalar sahiptir. Bununla birlikte yapılan deneysel çalışmalarda testiste oluşan hasarın antioksidan maddeler ile iyileştirilmesi amaçlanmıştır.

2.5 Pentoksifilinin diyabet tedavisindeki önemi

Pentoksifilin periferal ve serebral vasküler yatakta bozulmuş olan mikrosirkülasyonu iyileştiren bir metilksantin türevidir. Bu etkisi çoğunlukla siklik 3,5 fosfodiestraz (PDE) inhibisyonunu içermektedir. PDE protein kinaz A aktivasyonu ve intrasellüler cAMP artışına neden olmaktadır. PDE izoenzim süperailesi en az 11 gen ailesi (PDE 1-PDE 11) içermektedir. Son zamanlarda selektif PDE izoenzim inhibitörlerinin geliştirilmesiyle PDE izoenzimlerinin birçok patobiyolojik olaydaki spesifik rolleri tanımlanmıştır. Pentoksifilin, PDE 1-5 inhibisyonu yapmaktadır (LIN, 2005) Pentoksifilin kan akımını düzenlemek için kullanılmaktadır, özellikle de periferal arter (intermitant kladukasyo) ve serebrovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Pentoksifilin beyaz ve kırmızı kan hücrelerinin esnekliğini artırır, plazma fibrinojen konsantrasyonunu azaltarak kan viskozitesini azaltır ve trombosit agregasyonunu ve trombus oluşumunu azaltır.

Görüldüğü üzere testis dokusunun kan akımının yetersiz olması bu dokuyu oksidatif hasara karşı duyarlı yapmaktadır. Diyabet oksidan bir ortam oluşturarak testis dokusunda hasara neden olur. Pentoksifilin hem kan akımını düzenleyerek hem de antioksidan etki göstererek diyabetin testis dokusunda oluşturduğu hasarı iyileştirebilme potansiyeline sahiptir. Günümüze kadar araştırılmayan bu etkinin, bu proje ile araştırılması amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 ^{0}C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı. 150-200 gr (164.62±22.62) ağırlığındaki 2 aylık 50 adet erkek sıçanlar rastgele 5 gruba ayrıldı:

Grup I: Kontrol grubu

Grup II: Diyabetik grup

Grup III: Diyabet + pentoksifilin grubu

Grup IV: Diyabet + pentoksifilin grubu

Grup V: Pentoksifiln grubu

Deneklere diyabet oluşturulması için 40mg/kg intraperitoneal streptozotosin uygulandı. Uygulamadan 72 saat sonra kuyruktan alınan kan ile glukoz düzeylerine bakıldı. Kan glukoz düzeyleri 250mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

Pentoksifilin 50mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı. Grup III sıçanlara deneyin başlangıcından itibaren pentoksifilin uygulandı. Grup IV sıçanlara ise ilk bir ay serum fizyolojik, sonraki bir ay boyunca pentoksifilin uygulandı. Kontrol grubu deneklere ise aynı miktarda intraperitoneal serum fizyolojik uygulandı.

2. ayın sonunda sıçanlar dekapite edilmeden önce sıçan ağırlıkları ve kuyruk kanları ile kan glukoz değerleri tekrar ölçüldü. Daha sonra denekler ketamin + Xylazin anestezisi altında dekapite edilerek kanları alındı ve testis dokuları tartılarak çıkarıldı. Alınan kanlardan ELİSA yöntemiyle serum FSH, LH ve testosteron seviyelerine bakıldı. Testis dokuları dokuların bir kısmı histolojik incelemeler için bouin tespit solüsyonuna konuldu, bir bölümü RT-PCR incelemeleri için Trizol içinde, biyokimyasal incelemeler ve western blot için ise ependorf tüplerin içinde -80 derecede saklandı.

3.1 Doku takibi

Histolojik inceleme için alınan testis dokuları hemen Bouin solüsyonu ile tespit edildi. Bouin ile tespit edilen dokular daha sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol ile şeffaflaştırılan dokular paraplast içine gömüldü. Testis dokusunda oluşan histopatolojik değişiklikleri belirlemek için paraplast bloklardan alınan 5-6 µm kalınlığındaki kesitlere H&E ve Masson'un üçlü boyaları yapıldı. Testis dokusundaki hasar seminifer tübül çap ölçümü ve spermatogenetik seriye ait hücrelerin incelenmesi yoluyla yapıldı. Hemotoksilen-Eozin ile boyalı kesitlerde, Olympus BX51 mikroskobundaki Analysis LS Reserach programı kullanılarak seminifer tübül çapları (MSTD) ölçüldü. Seminifer tübül çapı ölçümü, her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 10 farklı alandaki tübül çapları 20'lik objektifteki farklı alanlardan ölçülerek yapıldı ve ortalama tübül çapları hesaplandı.

Spermatogenetik seriye ait hücrelerin incelenmesinde ise Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı. Bu skorlamada, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, tübülün içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif bir şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde kullanılmış olan JTBS değerlendirme kriterleri aşağıda tablo şeklinde verilmiştir (Tablo 1). Bu skorlama için her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 20'şer farklı tübül 20'lik objektifteki farklı alanlar incelenerek yapıldı. Her grup için ayrı ayrı 200 adet tübül değerlendirilerek ortalama Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) hesaplandı.

Tablo 1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlama Kriterleri.

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

3.2 İmmunohistokimya

Testis dokusunda oluşan nNOS, eNOS ve iNOS ekspresyonundaki farklılıkları belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle işaretleme yapıldı. Bunun için alınan 5-6 µm lik kesitler bir gece 60°C'de tutuldu, önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi, daha sonra fosfat tampon (PBS) ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 3X5 defa kaynatılan kesitler, 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 5 dakika %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edildi ve sonraki aşamalar için ABC staining system (*Santa Cruz, sc-2023*) boyama kiti kullanılacak. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika Blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler eNOS, iNOS, nNOS için primer antikoru ile 1 gece +4°C'de bekletildi ve ertesi gün 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra Avidin-Biotin (AB) enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteleri görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyoinze H_2O ile yıkandı. Gill hematoksilen ile karşıt boyanan kesitler birkaç kez deiyonize H_2O ile yıkandı. Son aşama olarak artan alkol serileri ile su uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler entellan ile

kapatıldı. Olympus BX51 model ışık mikroskobu altında DP71 model dijital fotoğraf makinesi ile görüntüler elde edildi. Her bir denekten beş farklı alandan elde edilen görüntülerden, Image J programında ekspresyon farklılığı açısından değerlendirildi.

3.3 Apoptozis(Tunel)

Testis dokusundaki apoptozisi göstermek için TUNEL yöntemi uygulandı. Uygulama için "*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein"(Roche) kiti kullanıldı. İşlem için, 5-6 µm kalınlığında alınan testis dokuları deparafinize ve ardından rehidrate edildikten sonra PBS ile yıkandı. Testis dokuları yıkandıktan sonra antijen geri kazanımı için 0.01 M sodyum sitrat tamponunda mikrodalga fırında 350 W'de 5 dakika bekletildi. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokular daha sonra kitin içinden çıkan TUNEL reaksiyon karışımı ile 37 ^{0}C'de nemli ve karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokulara 4,6-diamidine-2 '-fenilindol ile zıt boyama yapıldı. Gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatılan dokular Olympus BX–51 floresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda incelendi. Her bir kesitten en az 10 alandaki tübüller ve pozitif boyanan hücreler sayıldı. Apoptotik indeks (AI) iki şekilde oluşturuldu. AI-1, her yüz tübülde pozitif boyanan apoptotik hücrelerden; AI-2 ise her 100 tübülde pozitif boyanan apoptotik hücreye sahip tübüllerden hesaplandı.

3.4 ELISA

Deneklerden alınan kanlar sitrat içermeyen tüplere alındı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlardan ELİSA kitleri ile serum FSH, LH, ve testosteron seviyeleri belirlendi. Cusabio biotech rat elisa kit protokolüne göre testler yapıldı. Kitten çıkan bütün ürünler kullanmadan önce 30 dakika oda ısısında tutuldu. Kitten çıkan 15 ml yıkama solüsyonu distile su ile 300 ml'ye tamamlanarak yıkama solüsyonu hazırlandı. Her bir kuyucuğa 50 µl standart veya örneklerin serumları eklendi. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 50 µl HRP konjugatı ve 50 µl antikor eklenerek 37 ^{o}C'de bir saat inkübe edildi. Daha sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Kuyucuklara 50 µl substrat A ve B eklendi. Karıştırılıp 37 ^{0}C 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 50 µl sonlandırma solüsyonu eklendi ve 450 nm mikroplate'de okutuldu.

3.5 Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda -80 derecede saklanan doku örnekleri oda ısısında bir süre bekletildikten sonra PBS içinde homojenize edildi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 derecede 12000rpm de 30

dakika santrifüj edildi ve supernatantları alındı. Alınan süpernatantlar biyokimyasal analizler için kullanıldı.

3.5.1 Malondialdehid (MDA) Seviyesi Tayini

Metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA' ın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm'de absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Kısaca; 0,2 ml doku homojenatı, 0.8 ml fosfat tamponu (pH:7.4) ve 0.025 ml bitüle hidroksitoluen solüsyonu ile karıştırıldı 0,5 ml %30'luk TCA (trikloroasetik asit) eklendi, 120 dk buz üzerinde inkübe edildi ve akabinde 2000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. 1ml süpernatant, 0,075 ml 0,1 M EDTA ve 0,25 ml %1'lik Tiyobarbitürik asit (TBA), (0.05 NaOH içinde hazırlanmış) ile karıştırıldı, tüpler 15 dk su banyosunda kaynatılıp oda sıcaklığına kadar soğutularak, absorbansları 532 nm'de tayin edildi. Değerlendirme, MDA-TBA reaksiyonu sonucu oluşturulan standart eğri ile yapıldı.

3.5 2 Ksantin oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini

XO, aktivitesi Prajda ve Weber'in metoduna göre, ksantinden ürik asit oluşumu esnasında 293 nm'de absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçümü prensibi ile tayin edildi. Plazma, fosfat tamponu (pH 7.5 ve 50 mM) ve (her tüpte 0.067 mmol final konsantrasyonu olmak üzere) ksantin (4 mM) içeren deney ortamında 37 ºC'de 30 dk, inkübe edildi. Reaksiyon 0,1 ml %100'lük TCA çözeltisi eklenmesi ile durdurulup, 5000 x g'de 15 dk santrifüje edildi. Elde edilen berrak kısmın (ürat) absorbansı köre karşı ölçüldü. 1 ünite XO, 37 ºC'de pH 7.5'ta 1 dakikada oluşan µmol ürik asit olarak tarif edilip ve U/ml olarak hesaplandı.

3.5.3 Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) Seviyesi Tayini

Plazma AOPP düzeyleri, Witko-Sarsat ve ark tarafından geliştirilen metot ile tayin edildi. Metodun prensibi, plazmadaki uzun ömürlü oksidanlar ile çapraz bağlama ürünlerinin, potasyum iyodürü oksitlemesi ve açığa çıkan triiyodid iyonunun, 340 nm ölçülmesi esasına dayanır.

Kloramin-T stok solüsyonu (10 mmol/L) hazırlandıktan sonra, PBS (Phosphate Buffered Saline) (20 mmol/L, pH:7.4) ile 100 kez seyreltilerek 100 µmol/L konsantrasyonda ana standart çözeltisi (standart 1) elde edildi.

Kloramin -T ana standart çözeltisi (standart 1: 100 µmol/L) 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek için; PBS (20 mmol/L, pH 7.4) ile seyreltilerek 75, 50, 25, 12.5 µmol/L

konsantrasyonlarda Kloramin -T standartları hazırlandı. Kloramin -T stok solüsyon (100 mmol/L) 5°C'de 3-4 ay stabil iken, Kloramin-T seyreltilmiş çalışma solüsyonu (100 µmol/L) 5 °C'de 3-4 gün stabildir.

PBS (Phosphate-Buffered Saline) 20 mmol/L, pH:7.4 PBS; °5 C'de 6 ay stabildir.

Reaktif 1 (Potasyum İyodit): PBS (20 mmol/L, pH:7.4) içinde 1.16 mol/L olarak hazırlandı. KI; 5 °C'de 6 ay stabildir.

Reaktif 2 (Asetik Asid):96%, v/v olacak şekilde hazırlandı. Asetik asit; oda ısısında, özel cam şişesinde uzun dönem stabildir. Çalışma öncesinde oda ısısına getirilen örnekler ve standartlar çalışıldı.

Bunun için;

40 µL standart veya plazma üzerine 160 µL PBS eklenip karıştırılarak 25 sn inkübe edildi. Karışımın absorbansı 340 nm'de okutuldu. Sonra 20 µL asetik asit eklenip, 25 sn inkübe edildi. Son olarak 10 µL KI çözeltisi eklenip ve tekrar 25 sn inkübe edilip absorbans yeniden okutuldu. Tüm basamaklar 37 ºC'de tek küvette gerçekleştirildi ve zaman aralıkları her basamak için kullanılan analizörün program karakteristiklerine göre 25 sn veya daha uzun olacak şekilde ayarlandı. 5 standartın konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans (A) değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. AOPP konsantrasyonu, ölçülen absorbansa karşılık gelen µmol Kloramin -T/L olarak bildirildi.

3.5 4 Tiyol Seviyesi Tayini

Plazma tiyol seviyeleri Hu ve ark'nın metoduna göre ölçüldü. Metodun prensibi aşağıda reaksiyon denkleminde görüldüğü gibi Elman reaktifi [5.5' ditiyobis (2-nitrobenzoik asit); DTNB]'nin serbest tiyol gruplarıyla redüklenemsi sonucu oluşan koyu sarı renkli 5-tiyo-2 nitro benzoik asit (TNB)'in renk şiddetinin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

DTNB + 2R-SH → R-S-S-R ' <u>2TNB</u> (koyu sarı renk)

Plazma üzerine Tris-EDTA tampon ve 2,2-ditiyobisnitrobenzoik asit (DTNBya da Elman's reaktifi) eklendikten sonra, oda ısısında 15 dakika inkübe edilen karışımın absorbansı 405 nm'de okundu. Numune içermeyen bir reaktif körü ile, DTNB yerine metanol içeren bir numune körü benzer şekilde hazırlandı. Kalibratör olarak redükteglutatyon solusyonu (50-100 µmol/L) kullanıldı. Tiyol seviyeleri µmol/L olarak ifade edildi.

3.6 RT-PCR ile gen ekspresyonlarının incelenmesi

Dokular alındı ve 1 ml trizol içinde homojenize edildi. RNA izole edilinceye kadar -80 ^{0}C derecede tutuldu RNA izolasyonu yapılacağı zaman dokular buzdolabından çıkarıldı ve 37 ^{0}C de 5-10 dakika inkübe edildi. Dokular çözündükten sonra 1 ml trizollü doku içine 0.2 ml olacak şekilde kloroform ekleyip iyice vortekslendi. Dokular daha sonra 1200 rpm de 8 ^{0}C 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dokuda 3 faz oluşur. Altta kırmızı trizollü faz (protein içerir), ortada beyaz faz (DNA içerir), üstteki şeffaf faz (RNA içerir). Üst kısımda bulunan RNA içeren şeffaf tabaka dikkatli bir şekilde başka bir tüpe alındı. Şeffaf faz üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklendi ve iyice vortekslendi. Daha sonra 15-30 dakika -20^{0}C de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler 12000 rpm de 8 ^{0}C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpün alt kısmında beyaz bir pellet oluştu ve süpernatanı pipet yardımıyla uzaklaştırdıktan sonra, pellet üzerine 1 ml %75 etanol eklendi ve biraz vortekslendikten sonra 7500 rpm de 8 ^{0}C'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra yine pipet yardımıyla etanol uzaklaştırıldı ve tüpler 37 ^{0}C'de pelletin üzerindeki etanol kuruyuncaya kadar bekletildi. Pellet kuruduktan sonra üzerine 100 µl RNAase- free su ekleyip pelletin iyice çözülmesi sağlandı. Elde edilen RNA'ların kalitesini öğrenmek için Nano drop(=Spektrofotometre)'ta ölçüm yapıldı ve en az µl'de 200ng RNA olacak şekilde RNA'dan cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA (Komplementer DNA) elde edildi. cDNA'dan nNOS, eNOS, iNOS mRNA ekspresyonları ve House-keeping gen (Beta-aktin ve GAPDH) primer probları kullanılarak ayrı ayrı Quantitatif PCR yapılarak expresyon değerlendirmeleri yapıldı (Tablo 2).

Tablo 2. RT-PCR'da kullanılan primerlerin gen dizilimleri.

Organizma	**Gen sembol leri**	**Gen Tanımlaması**	**Assay ID**	**İleri primer dizilimi**	**Ters primer dizilimi**	**UPL Prob No**
R. norvegicus	GapdH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	502303	AAAGCTGTGGCGTGATGG	TTCAGCTCTGGGATGACCTT	26
R. norvegicus	Nos1	Neuronal nitric oxide synthase	505837	CGTCCGTGACTACTGTGACAA	TGTCCAAATCCATCTTCTTGG	65
R. norvegicus	Nos2	İnducible nitric oxide synthase	503518	AGAAGGGGACGAACTCAGC	TCGAACATCGAACGTCTCAC	26
R. norvegicus	Nos3	Endothelial nitric oxide synthase	500228	TGACCCTCACCGATACAACA	CGGGTGTCTAGATCCATGC	5

R. norvegicus	Actb	Beta actin	500152	CTAAGGCCAA CCGTGAAAAG	GCCTGGATGG CTACGTACA	115

3.7 Western blot

3.7.1 nNOS, eNOS ve iNOS proteinlerinin Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

nNOS, eNOS ve iNOS proteinlerinin varlığını göstermek amacıyla SDS-PAGE ile testis dokusundaki protein analizi yapıldı. SDS-PAGE analizi şu şekilde yapıldı: Biri cam diğeri mika olan 20x20x0.5 cm ebatlarındaki elektroforez kasetinin her iki yanına ve alt tarafına 0.5 cm kalınlığındaki çubuklar yerleştirildi ve sıvı sızdırmayacak şekilde bantlandı. Hazırlanan 25 ml %8'lik ayırıcı jel (seperasyon jel; 11.5 ml dH_2O, 6.7 ml %30 poliakrilamid, 6.3 ml 1.5 M Tris pH=8.8, 250 µl %10'luk SDS, 250 µl amonyom persülfat, 15 µl N,N,N,-N tetrametiletilenamin (TEMED) solüsyonu) elektroforez kasetinin içine döküldü. Yüzey gerilimini azaltmak ve jelin hava ile temasını keserek polimerizasyonu kolaylaştırmak amacıyla jelin üzerine hemen 2 ml bütanol eklendi ve polimerizasyon için 30 dk bekletildi. Kaset içinde polimerize olan jelin üzerine 20 ml %5'lik yığınlayıcı jel (stacking jel; 12.6 ml dH_2O, 3.4 ml %30 akrilamid karışımı, 2.5 ml 1 M Tris pH=6.8, 200 µl %10 amonyum persülfat, 20 µl TEMED içeren solüsyon) döküldü. Vakit kaybetmeden örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve polimerizasyon için 30 dk beklendi. Tarak çıkarılarak kuyucuklar dH_2O ile yıkandı ve jel parçacıkları temizlendi. Elektroforez kaseti soğutmalı elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, Tris-glysine elektroforez solusyonu (950 ml dH_2O içerisinde 94 gr glisin ve 1.51 gr Tris base çözüldü ve 50 ml %1 SDS ilavesi ile 5X stok hazırlandı) ile dolduruldu. Anot ve Katot kabloları tanka bağlanarak 100 Volt sabit akımla 10 dk oda ısısında ön elektroforez yapıldı. Kuyucuklara, örnekler toplamda 100 µgr protein içerecek şekilde 40 µl, moleküler ağırlık markeri 5 µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforez işlemi oda ısısında 100 Volt akımla 4 saatte gerçekleştirildi

3.7.2 SDS-PAGE'te elde edilen nNOS, eNOS ve iNOS proteinlerine ait bandların Western blotting yöntemiyle doğrulanması

Elektroforezin dördüncü saatinin sonunda elektirik akımı kesilerek elektroforez kaseti tanktan çıkarıldı. Yığınlama jeli kesilip atılarak, jel ile aynı ebatlarda PVDF membran ve 6 adet Whatmann 3M kurutma kağıdı hazırlandı. PVDF membran metanolde; ikişer adet kurutma kağıdı ise Anot Solüsyonu I (0.3 M Tris pH=10.4, %20 metil alkol), Anot Solüsyonu II (0.0025 M Tris pH 10.4, %20 metil alkol) ve Katot Solüsyonu (0.025 M Tris pH 9.4, %20 metil alkol)'nda 10'ar dk. bekletildi. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi

Semi Dry System'de gerçekleştirildi. Transfer cihazına anottan Katota doğru sırasıyla; Anot I ve Anot II'de ıslatılmış kurutma kağıtları, nitroselüloz membran, jel ve en son olarak da katotta bekletilmiş kurutma kağıtları konuldu. Anot ve Katot kabloları güç kaynağına bağlandı ve transfer işlemi oda ısısında 10 mA akımla 2 saatte tamamlandı. İşlem sonunda PVDF membran bloklanması amacıyla; sulandırma solüsyonu (%0.02 Tween 20 PBS) ile sulandırılan %5'lik yağsız süt tozunun bulunduğu kaba konularak membranlar oda ısısında sallayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Daha sonra primer antikorlar bloklama solusyonuyla belirtilen oranda sulandırılacak ve üzerlerine membranlar bırakılarak $4^{o}C$'de sallayıcı üzerinde bir gece bekletildi. Ertesi gün membran PBS-T ile 5X15 dakika yıkandı. Ardından membranlar sulandırma solüsyonu ile 1/5000 oranında sulandırılan goat Anti rabbit IgG HRP ile bir kap içersinde oda ısısında sallayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Kap içindeki konjuge dökülerek membranlar 15'er dk'lık sürelerle 5 kez oda ısısında yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra ECL detection reagent (Amersham) ile muamele edilen membrablar Prizma fusion SX vilber lourmat jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen görüntüler Image J programında analiz edilip gruplar arasındaki fark belirlendi.

4. BULGULAR

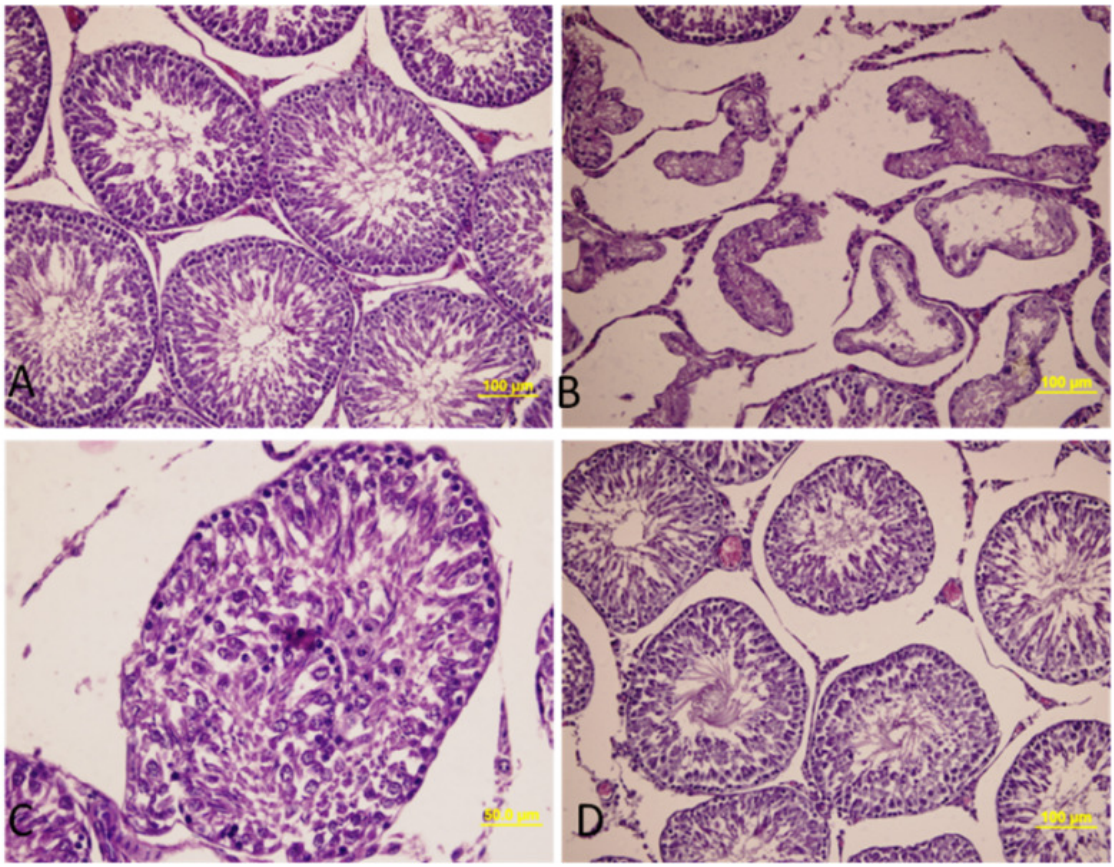
Deneyin başında sıçanların vücut ağırlıkları ve kan şekerleri birbirlerine yakın düzeydeydi. Ancak deneyin sonunda grup II, grup III ve grup IV'ün ortalama vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrole göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Benzer şekilde diyabet gruplarına ait sıçanların (grup II, grup III ve grup IV) kan şekeri düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı. Testis ağırlıklarına bakıldığında ise sadece grup II'nin ortalama testis ağırlıklarının kontrole göre azaldığı belirlendi.

Tablo 3. Sıçanların vücut ve testis ağırlıkları ile kan glukoz değerleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

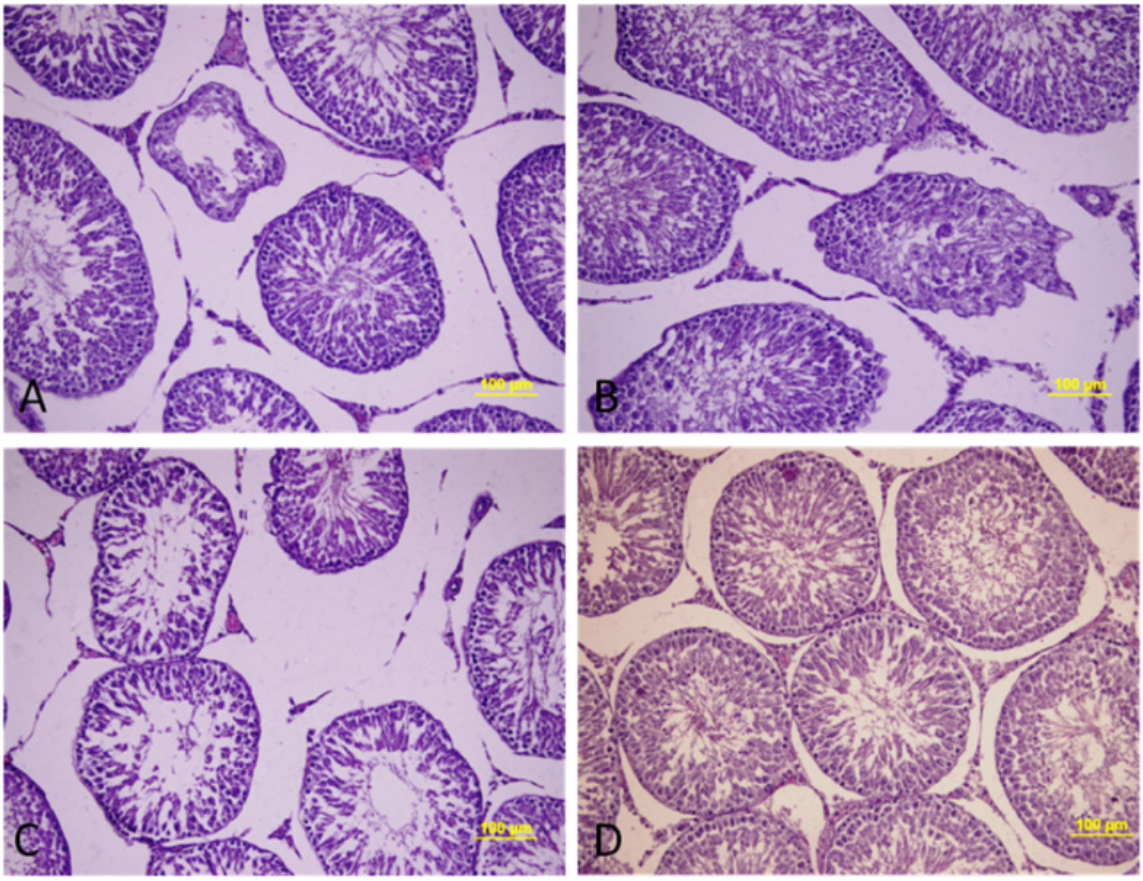
	Sıçan ağırlıkları (gr)	**Kan şekeri (mg/dl)**	**Testis ağırlıkları (gr)**
Grup I	282.12±9.74	119.25±3.84	1.28±0.05
Grup II	190.20±13.23*	565.50±23.11*	1.07±0.05*
Grup III	221.77±19.43*	545.44±25.54*	1.16±0.04
Grup IV	198.22±14.00*	531.88±36.30*	1.10±0.04
Grup V	300.00±12.35	122.00±8.69	1.35±0.02
*P<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında.			

4.1 Histolojik bulgular

Yapılan mikroskopik incelemede kontrol grubu deneklere ait testis dokularının normal histomorfoloji sergilediği görüldü. Benzer şekilde sadece pentoksifilin uygulanan grubun testis dokuları da normal histolojik görüntü sergiledi. Streptozotosin ile diyabet oluşturulan grup II sıçanların testis dokularında yer yer atrofik seminifer tübüllere, seminifer tübül epitelinde lümene dökülme ve seminifer tübül epitelinde düzensizlikler görüldü (Şekil 1). Benzer bulgulara daha az sıklıkta olmak üzere grup III ve grup IV'deki deneklerin testis dokularında da rastlandı (Şekil 2). Testis dokusundaki hasarı skorlamak için Ortalama seminifer tübül çapları ölçüldü (MSTD), ayrıca spermatogenetik serideki hasar derecesini belirlemek için ise Johnsen'in tübüler biyopsi skoru (JTBS) kullanıldı (Tablo 4). Grup II deneklerin MTSD ve JTBS değerleri kontrole göre azalmıştı. Pentoksifilin tedavisiyle MTSD değerlerinde düzelme belirlendi ancak JTBS değerlerinde artma olmasına rağmen bu anlamlı değildi.



Şekil 1. Farklı gruplara ait testis dokusu histolojik görüntüsü. **(A)** Kontrol grubuna ait testis dokusu normal histolojik görüntü sergilemekte. (B)Grup II'ye ait testis dokusunda atrofik seminifer tübüller dikkati çekmekte. **(C)** Gup II'ye ait testis dokusunda seminifer tübül lümeninde epitelyum hücre döküntüleri ayırt edilmekte **(D)** Grup III'e ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde kısmen düzensizlikler görülmekte. Hematoksilen & Eozin.



Şekil 2. Farklı gruplara ait testis dokusu histolojik görüntüsü. **(A)** Grup III'e ait testis dokusunda atrofik seminifer tübül görülmekte. **(B)** Grup IV'ye ait testis dokusunda seminifer tübül lümeninde epitel hücre döküntüleri ayırt edilmekte. **(C)** Gup IV'ye ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde kısmen düzensizlikler görülmekte **(D)** Grup V'e ait testis dokusu norma histoloji sergilemekte. Hematoksilen & Eozin.

Tablo 4. Sıçanların ortalama seminifer tübül çapları ve Johnsen tübüler biyopsi skorları ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

	Ortalama Seminifer tübül çapı (µm)	**Johnsen biyopsi skoru**
Grup I	255.88±4.74	9.32±0.09
Grup II	233.09±5.76*	6.86±0.34*
Grup III	260.33±5.37	7.26±0.30*
Grup IV	244.45±5.56	7.50±0.30*
Grup V	289.33±2.88	8.40±0.10
*P<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında.		

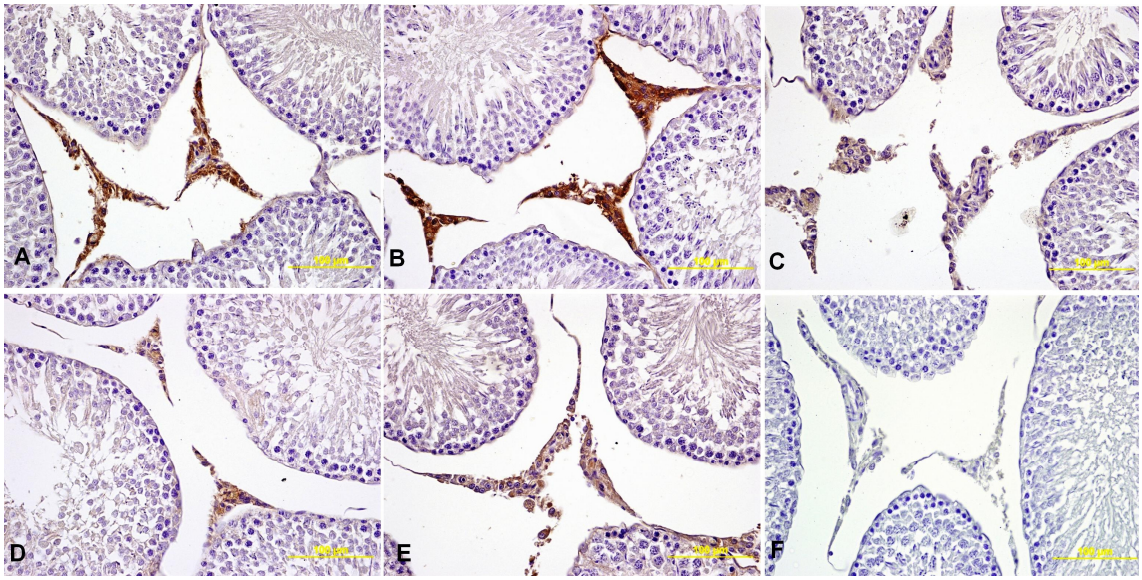
4.2 İmmunohistokimya bulguları

NOS'ların testis dokusundaki ekspresyonlarını belirlemek üzere avidin-biotin yöntemi ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. Gruplara ait NOS ekspresyon skorlama sonuçları tablo

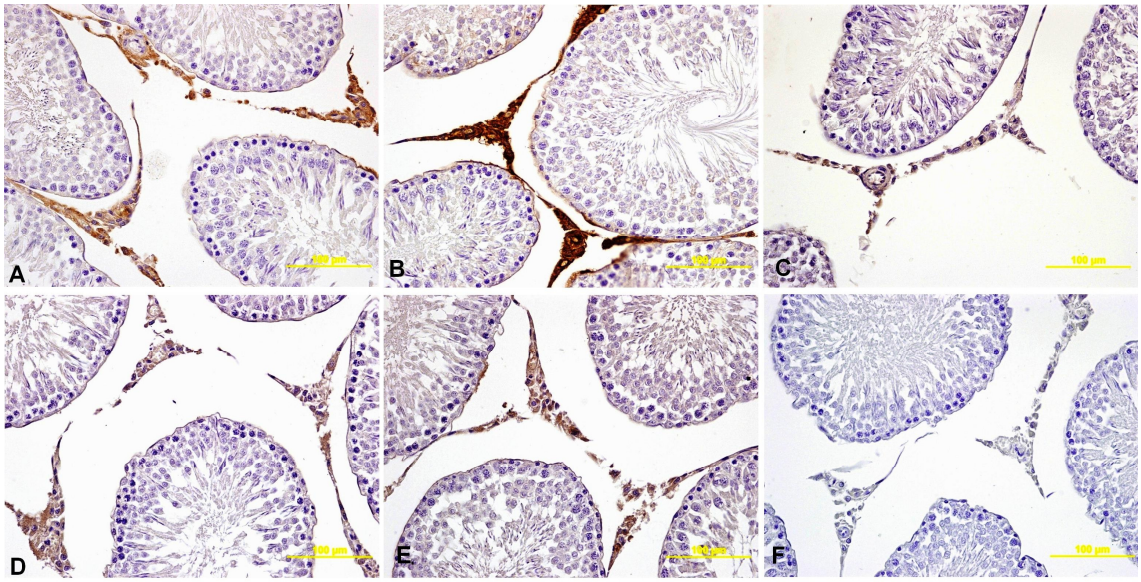
5'de gösterilmektedir..Her üç NOS (eNOS, iNOS ve nNOS) ekspresyonu testis dokusunda intertisyel alanda gözlendi. Diyabetik sıçanların NOS ekspresyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştı. Diyabet ile birlikte pentoksifilin tedavisi alan grupların NOS ekspresyonları diyabetik gruba göre anlamlı derecede azalmıştı. Sadece pentoksifilin alan deneklerin NOS ekspresyonları kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi.

Tablo 5. Sıçanların testis dokusundaki eNOS, iNOS ve nNOS ekspresyon skorlamaları ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

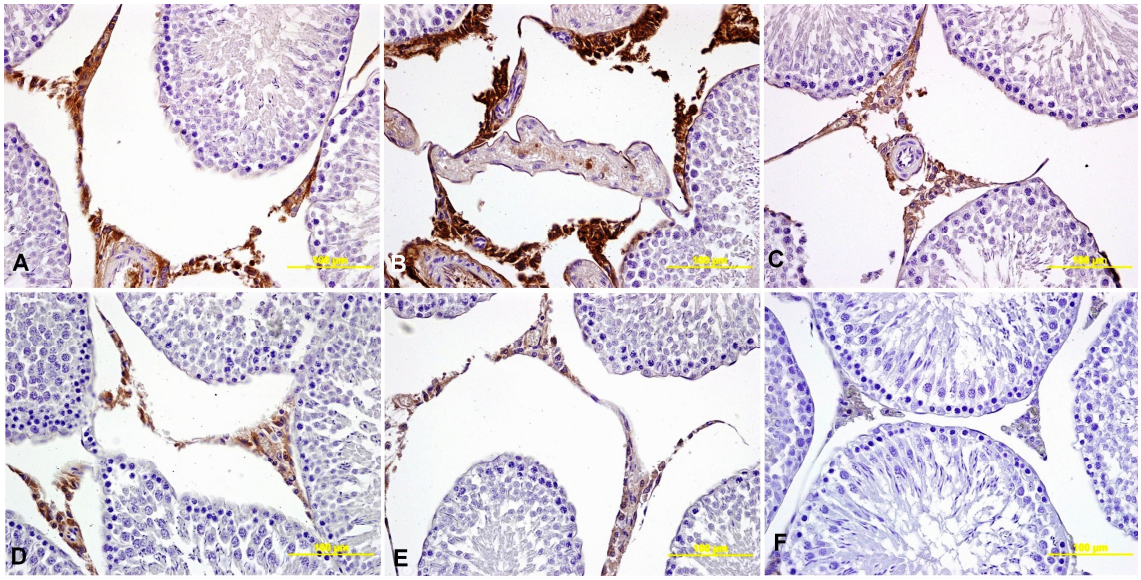
	nNOS	**eNOS**	**iNOS**
Grup I	107.51±1.10	102.82±1.33	114.01±1.64
Grup II	132.36±1.52*	124.41±1.76*	123.21±1.31*
Grup III	101.80±0.99	99.44±0.99	114.44±1.89
Grup IV	103.29±1.69	95.21±1.32	108.32±1.47
Grup V	102.00±0.99	97.30±0.71	112.53±1.80
*P<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında.			



Şekil 3. Farklı gruplara ait testis dokusunda eNOS immunohistokimya boyama görüntüleri. eNOS ekspresyonu intertisyel alanda kahverengi olarak gözlenmekte. **(A)** Kontrol **(B)** Grup II **(C)** Grup III **(D)** Grup IV **(E)** Grup V **(F)** Negatif kontrol.



Şekil 4. Farklı gruplara ait testis dokusunda iNOS immunohistokimya boyama görüntüleri. iNOS ekspresyonu intertisyel alanda kahverengi olarak gözlenmekte. **(A)** Kontrol **(B)** Grup II **(C)** Grup III **(D)** Grup IV**(E)** Grup V **(F)** Negatif kontrol

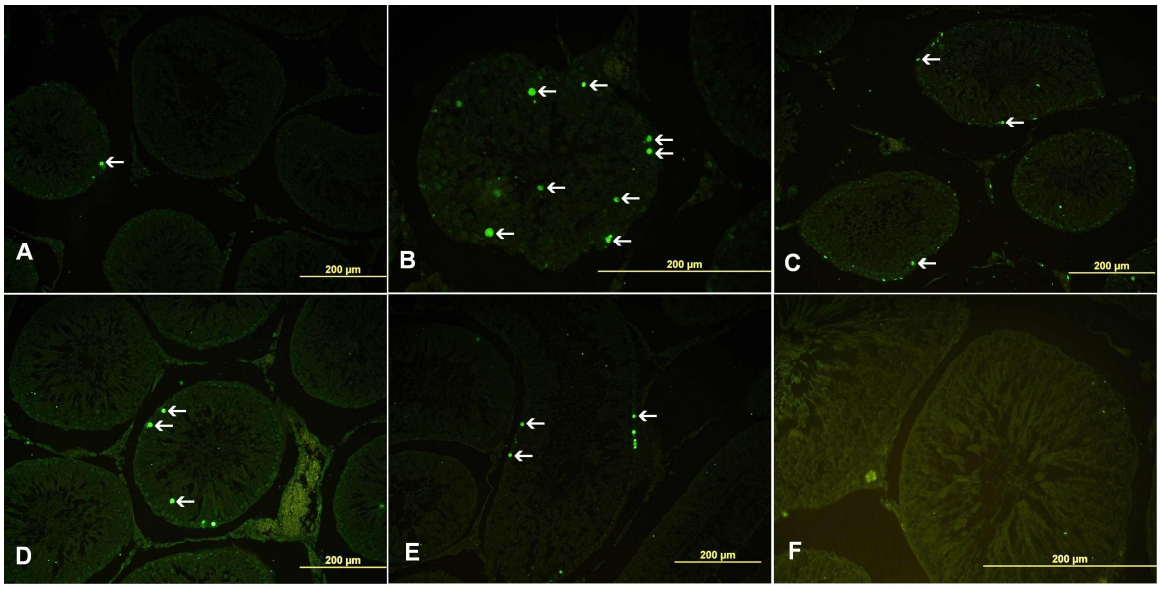


Şekil 5. Farklı gruplara ait testis dokusunda nNOS immunohistokimya boyama görüntüleri. nNOS ekspresyonu intertisyel alanda kahverengi olarak gözlenmekte. **(A)** Kontrol **(B)** Grup II **(C)** Grup III **(D)** Grup IV**(E)** Grup V **(F)** Negatif kontrol

4.3 Apoptozis (Tunel) Sonuçları

Testis dokusundaki apoptotik hücreleri belirlemek için TUNEL boyama yapıldı (Şekil 6). Apoptotik indeks sonuçları tablo 5'de verilmektedir. Diyabet oluşturulan sıçanların testis

dokusundaki apoptotik hücre sayısında artma gözlendi. Tedavi amaçlı verilen pentoksifilinin apoptotik hücre sayılarında herhangi bir iyileşme yapmadığı belirlendi.



Şekil 6. Farklı gruplara ait testis dokusunada TUNEL boyama görüntüleri. Apoptotik hücreler (ok) floresan mikroskopta yeşil ışıma göstermekte. **(A)** Kontrol **(B)** Grup II **(C)** Grup III **(D)** Grup IV**(E)** Grup V **(F)** Negatif kontrol

Tablo 6. Gruplara ait apoptotik indeksler (AI-1 ve AI-2) ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

	AI-1	**AI-2**
Grup I	36.43±10.87	20.37±6.05
Grup II	72.48±20.32*	34.17±9.68*
Grup III	76.62±18.12*	35.14±8.27*
Grup IV	84.64±31.73*	33.82±10.01*
Grup V	56.65±12.90	26.32±3.25
*P<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında.		

4.4 ELISA Bulguları

Deney sonunda yapılan serum FSH, LH ve Testosteron seviyeleri tablo 7'de gösterilmektedir. Diyabet sonucunda serum LH ve testosteron düzeylerinin azaldığı belirlendi. Bu azalma serum LH düzeyinde grup IV' de ve serum testosteron düzeylerinde ise diyabetik tüm gruplarda kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklıydı. Serum FSH düzeylerine bakıldığında ise sadece grup IV'ün kontrole göre anlamlı derecede azaldığı gözlendi.

Tablo 7. Gruplara ait serum FSH, LH ve Testosteron seviyeleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir

	Serum LH (mlU/ml)	**Serum FSH (mlU/ml)**	**Serum Testosteron(ng/ml)**
Grup I	10.6±0.48	92.14±3.96	3.40±0.80
Grup II	9.25±0.56	94.88±2.40	1.32±0.44*
Grup III	9.27±0.64	91.40±1.82	1.27±0.20*
Grup IV	7.63±0.64*	63.36±6.48*	0.78±0.24*
Grup V	11.64±0.40	87.09±4.76	1.66±0.41
*P<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında.			

4.5 Biyokimya bulguları

Yapılan biyokimyasal incelemelerde grup II deneklerin testis dokularında MDA, AOPP ve ksantin oksidaz değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 8). Diyabet ile birlikte tedavi amaçlı verilen pentoksifilin gruplarında ise değerlerde azalma mevcuttu, ancak bu azalma yine istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 8. Gruplara ait doku MDA, AOPP, Ksantin oksidaz ve tiyol seviyeleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

	AOPP (nmol/gr protein)	**MDA (nmol/gr protein)**	**Ksantin oksidaz (U/ml)**	**Tiyol (µmol/L)**
Grup I	147.02±9.05	20.54±3.63	0.62±0.03	422.00±21.93
Grup II	155.04±7.64	32.51±5.45	0.78±0.08	493.70±69.09
Grup III	140.83±4.80	29.37±7.29	0.47±0.09	623.00±65.01
Grup IV	138.91±5.68	27.67±5.38	0.54±0.07	487.66±63.58
Grup V	142.90±4.53	29.73±9.71	0.42±0.08	655.50±72.94

4.6 RT-PCR bulguları

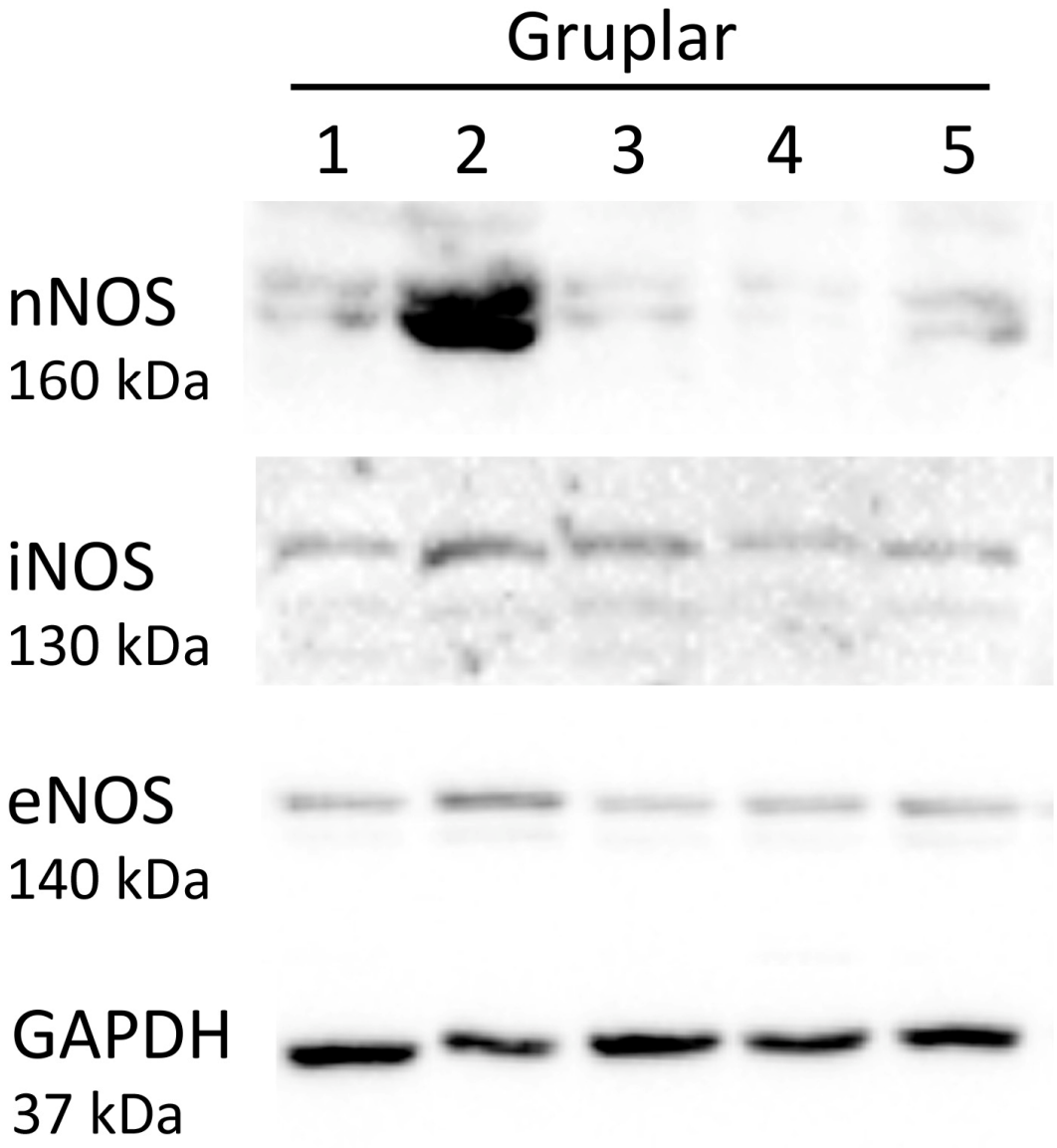
NOS1, NOS2 ve NOS3 mRNA düzeyleri değerlendirildiğinde diyabet oluşturulan grubun düzeyleri kontrole göre anlamlı derece artmıştı. Diyabet ile birlikte pentoksifilin verilen gruplarda her üç gen için ekspresyon değerleri kontrol grubuna benzerlik gösteriyordu.

Tablo 9. Sıçanların testis dokularındaki NOS1, NOS2 ve NOS3 mRNA değerleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

	NOS1	**NOS2**	**NOS3**
Grup I	10.66±3.94	22.81±10.33	17.06±6.26
Grup II	42.73±8.98*	60.34±13.59*	71.53±17.61*
Grup III	22.30±8.81	21.64±8.73	15.79±9.74
Grup IV	19.21±9.91	12.97±4.38	15.41±6.37
Grup V	3.16±2.78	1.02±0.46	2.09±0.90
*P<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında.			

4.7 Western Blot bulguları

Testis dokusundaki NOS ekspresyonu immunohistokimyasal inceleme yanı sıra western blot analiziyle de çalışıldı. Yapılan western blot sonucunda diyabetik sıçanların testis dokusundaki her üç NOS ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha güçlü bir bant verdiği belirlendi (Şekil 7). Pentoksifilin tedavisi ile NOS ekspresyonlarının azaldığı gözlendi.



Şekil 7. Farklı gruplara ait testis dokusundaki NOS ekspresyonlarını gösteren jel görüntüsü. Diyabetik deneklerin her üç NOS (iNOS, nNOS ve eNOS) ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış dikkati çekmekte. **1**; grup I **2**; grup II **3**; grup III **4**; grup IV **5**; grup V.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

DM modern dünya sağlığını en ciddi şekilde tehdit eden hastalıkların merkezinde bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün öngörülerine göre 2030 yılında dünyadaki diyabetli sayısı 366 milyona ulaşacaktır. DM, pankreasdaki insulin üretiminin yetersiz olması ya da

üretilen insülinin vücutta efektif kullanılamaması sonucunda oluşan kronik bir hastalıktır. Hiperglisemi, kontrol altında olmayan diyabetin en yaygın etkisidir ve uzun süre geçtikçe özellikle sinir ve kan damarları gibi vücuttaki birçok sistem üzerine etkilidir (ROESSNER, 2014).

Reproduktif sistem hem kadında hem de erkekte diyabetin etkilediği sistemlerden biridir. Diyabet sıklığının giderek artması diyabete bağlı infertilitenin insan sağlığında önemli bir yer almasına neden olmaktadır. DM erkek fertilitesini birçok seviyede etkileyerek bozmaktadır. Spermatogenezisin endokrin kontrolü, spermatogenezisin kendisini, penil ereksiyon ve ejekülasyonu bozabilmektedir (LA VİGNERA, 2012; SEXTON 1997). Yapılan birçok çalışmada diyabetik erkeklerin sperm sayı, motilite ve morfolojisinde bozukluklar olduğu ortaya konmuştur (DELFINO 2007; AGBAJE, 2007). Birçok çalışmada diyabetlilerde artmış ROS üretiminden dolayı oksidatif stresin arttığı, ayrıca ROS üretimindeki artış sonucunda semen parametrelerinde bozulma ve apoptozisde artış olduğu rapor edilmiştir (LA VİGNERA, 2012). Bizimde yaptığımız bu çalışmada diyabetin sperm üretimini birçok seviyede etkilediği ortaya koyuldu. Diyabetik sıçanların serum LH ve testosteron seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştı ve bu spermatositogenezisin endokrin olarak etkilendiğini; histolojik ve biyokimyasal oksidatif parametrelerin ise değişmesi spermatositogenezisin direkt olarak etkilendiğini göstermektedir. Diyabetik gruptaki sıçanların testis dokusundaki oksidatif parametrelerin ve apoptozis oranının kontrol grubuna göre arttığı, Johnsen biyopsi skoru ve ortalama seminifer tübül çapının ise kontrol sıçanlara göre azaldığı belirlendi.

Diyabetin organlar üzerinde oluşturduğu hasarın artmış olan glukoz seviyesi nedeniyle kaynaklandığı bilinmektedir. Endotelyal hücreler ekstrasellüler glukoz artışının oluşturduğu toksik etkilere karşı çok duyarlıdır. Çünkü endotel hücreleri artmış ekstrasellüler glukozu kompense edemezler, bunun sonucunda da hücre içi glukoz miktarı da artar. Artan hücre içi glukozun metabolizması aldoz reduktaz, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, NAD(P)H oksidaz aktivasyonu gibi birçok yol ile olmaktadır. (BROWNLEE, 2001). Bu endotelyal bozukluğun mekanizmasını belirlemek üzere son 30 yıldır çok fazla çalışma yapılmıştır. Endotelyal hücreler vazoaktif madde, hormon ve sitoprotektif biyolojik faktörler üretmektedir. Son 10 yılda diyabetik damar hastalıkları üzerine yapılan çalışmalar endotel hücreleri tarafından üretilen ve vasküler hemostaziste çok önemli bir rol oynayan Nitrik oksit (NO) üzerine yoğunlaşmıştır. NO normalde L-argininden endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)

aracılığı ile oluşur. NO endotel bağımlı vazorelaksasyonu başlatır. NO aynı zamanda antiproliferatif etkilidir ve damar endoteline trombosit ve lökosit bağlanmasını da inhibe eder. Bu nedenle NO damar koruyucu bir moleküldür. Ancak kolaylıkla süperoksit ile reaksiyona girebilir ve oldukça reaktif bir ürün olan peroksinitrit üretir. Bu nedenle NO'in kimyasal çevresi örneğin oksijenin varlığı NO'in zararlı mı yoksa faydalı mı olacağına karar verir. Diyabetes mellitustaki temel problemlerin hiperglisemiden kaynaklandığı bilinmektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir. Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar. Ancak diyabette NO'nun arttığını rapor eden araştırmacılarda bulunmaktadır (ABOU-SEIF, 2004). NO'ların diyabetin patofizyolojisindeki rolü üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Diyabetik nefropati üzerine yapılan çalışmada NOS'ların özellikle de eNOS'un diyabetik nefropatinin patogenezinde önemli rol oynayabileceği henüz bu yıl ortaya konmuştur (DELLAMEA, 2014). Yapılan bu çalışma diyabetin testis dokusunda oluşturduğu hasar üzerine NOS'ların etkisini inceleyen ilk çalışma olmaktadır. Bu amaçla bu çalışmada testis dokusundaki NOS aktivitesi immunohistokimya, western blot ve RT-PCR analizleri ile incelendi. Yapılan immunohistokimyasal boyamada NOS'lar testis dokusunda intertisyel alanda eksprese olmaktaydı. Diyabet sonucunda her üç NOS ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı artış belirlendi. Bu artış western blot ve PCR analizleri sonucunda da belirlendi. Diyabetik testis dokusunda NOS'lar hem protein hem de mRNA düzeyinde artış gösterdiği ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda streptozotosin ile oluşturulan diyabetin testiste oluşturduğu hasar üzerine de çeşitli antioksidan maddeler denenmiştir. Tang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada antioksidan olarak fruktoz 1,6 disfosfat vermişler ve ROS ürünlerinin baskılanmasıyla testisteki patolojik değişikliklerin hafiflediğini tespit etmişler (TANG, 2008). Güneli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada melatonin uygulamasının testisteki patolojik değişikleri ve apoptotik hücre sayısını azalttığını belirlemişlerdir (GUNELI, 2008). Armağan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise diyabetik sıçanlara uygulanan melotoninin testis

dokusundaki lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan enzimlerinin aktivitelerini düzenlediği belirlemiştir (ARMAGAN, 2006).

Diyabetik nefropatinin tedavisi için oldukça fazla preparat kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda streptozotosin ile oluşturulan diyabetik sıçanlara uygulanan pentoksifilinin renoprotektif ve antiproteinürik olduğu gösterilmiştir. Chen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pentoksifilinin böbrek mezangiyal hücrelerinin aktivasyon ve proliferasyonunu baskılayarak proteinüriyi engellediğini ortaya koymuştur.(CHEN, 1999). Guarrero-romero ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise hem tip 1 hem de tip 2 diyabette pentoksifiln proteinüriyi azaltmıştır (GUERRERO-ROMERO, 1995.). Son zamanlarda ise pentoksifilinin kan akımı üzerine olan etkisinin yanında antioksidan özellikleri de ortaya konmuştur. Davila-Esqueda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada streptozotosin ile oluşturulan diyabetik sıçanlara 8 hafta boyunca uygulanan pentoksifilinin böbrek dokularında lipit peroksidasyon ürünlerini azalttığını göstermişlerdir (DÁVİLA-ESQUEDA, 2004). Pentoksifilin aynı zamanda testis dokusu üzerine de çalışılmıştır. Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada testis torsiyone yapılan sıçanlara verilen pentoksifilinin apoptotik hücre sayısı ve MDA düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (LIU, 2006). Savaş ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pentoksifilin uygulamasının testiste detorsiyon sırasında kan akımını düzelttiğini göstermişlerdir (SAVAS, 2002). Yapılan bu çalışmada diyabetin testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı antioksidan özelliklerinden faydalanmak üzere pentoksifilin tedavisi çalışıldı. Pentoksifilin tedavisinin özellikle diyabetin fizyopatolojisinde rol aldığı düşünülen NOS'ların ekspresyonlarını önemli derecede iyileştirdiği belirlendi.

Sonuç olarak tedavi edilmeyen diyabet, yüksek seyreden kan glukoz düzeyleri nedeniyle testis dokusunda hem gen düzeyinde, hem de biyokimyasal ve histolojik olarak hasara neden olmaktadır. Diyabetin testis dokusundaki etkisi multifaktöriyeldir. Diyabet sonucunda testis dokusunda artan NOS'lar bu hasardan sorumlu olabilirler. Tedavi amaçlı verilen pentoksifilin ise NOS'ların ekspresyonlarını azaltarak kısmen iyileşme sağlamaktadır.

Öneri

Çalışmanın sonucunda diyabetin testis dokusunda oluşturduğu hasarda NOS'ların seviyesinin arttığı belirlendi. NOS inhibitörleri kullanarak NOS'ların baskılanması ile bu hasarın engellenip engellenemeyeceğinin araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

ABOU-SEIF, MA., Youssef, A., Evaluation of some biochemical changes in diyabetic patients, Clinica Chimica Acta, 346, 161–170, (2004).

AGBAJE, I.M., Rogers, D.A., McVicar, C.M., McClure, N., Atkinson, A.B., Mallidis, C., Lewis, S.E., Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. Hum. Reprod. 22, 1871–1877, (2007)

ALTAN, N., Ongun, CÖ., Elmalı, E., Kılıç, N., Yavuz, Ö., Sancak, B., Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione and Glutathione perioxidase activity in Alloxan Induced Diabetic Rat Hepatocytes, General Pharmacology, 25(5), 875-87, (1994).

ALTAN, N., Ongun, CÖ., Hasanoğlu, E., Engin, A., Tuncer, C., Sindel, P., Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase Activity In Alloxan-Induced Diabetic Rat Hepatocytes, Diabetes Research and Clinical Practice, 22(2-3), 95-98, (1994).

ARMAGAN, A., Uz, E., Yilmaz, HR., Soyupek, S., Oksay, T., Ozcelik, N., Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis, Asian J Androl, 8(5), 595-600, (2006).

BAKER, HW., Reproductive effects of nontesticular illness, Endocrinol Metab Clin NorthAm, 27, 831–850, (1998).

BAYNES, JW., Role of oxidative stress in development of complications in diabetes, Diabetes, 40(4), 405-412, (1991).

BAYNES, JW., Thorpe, SR., Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm, Diabetes, 48(1), 1-9, (1999).

BROWNLEE, M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, Nature, 414, 813–820, (2001).

BUKAN, N., Sancak, B., Yavuz, Ö., Koca, C., Tutkun, F., Özçelikay, TA., ltan, N., Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels n the liver of streptozotocin-induced diabetes rats, Indian ournal of Biochemistry and Biophysics, 40(6), 447-450, (2003).

CAI, L., Hales, BF., Robaire, B., Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide, Biol Reprod, 56, 1490–1497, (1997).

CAİ, L., Chen, S., Evans, T., Deng, DX., Mukherjee, K., Chakrabarti, S., Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism, Urol Res, 28, 342–347, (2000).

CHEN, Y.M., Chien, C.T., Hu-Tsai, M.I., Wu, K.D., Tsai, C.C.,Wu, M.S., and Tsai, T.J., Pentoxifylline attenuates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis, Kidney Int, 56(3), 932–943, (1999).

COLLİN, O., Damber, JE., Bergh, A., Effects of endothelin- 1 on the rat testicular vasculature, J Androl, 17, 360–366, (1996).

DÁVİLA-ESQUEDA, ME., Martínez-Morales, F., Pentoxifylline diminishes the oxidative damage to renal tissue induced by streptozotocin in the rat, Exp Diabesity Res, 5(4), 245-51, (2004).

DELFİNO, M., Imbrogno, N., Elia, J., Capogreco, F., Mazzilli, F., Prevalence of diabetes mellitus in male partners of infertile couples. Minerva Urol. Nefrol. 59, 131–135, (2007)

DELLAMEA BS[1], Leitão CB, Friedman R, Canani LH. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. Diabetol Metab Syndr. 12;6(1):17, (2014)

ELMALI, E., Altan, N., Bukan, N., Effect of sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozotocin- induced diabetic rats, Drugs R.D., 5(4), 203-8, (2004).

ENGIN, A., Altan, N., Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells, Hematologia, 30(2), 91-96, (2000).

ENGİN, A., Altan, N., Işık, E., Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism, Drugs R D, 6(1), 35-40, (2005).

ENGİN, A., Bozkurt, BS., Altan, N., Memiş, L., Bukan, N., Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile uct obstruction, World Journal of Surgery, 27(3), 253-5, (2003).

GUERRERO-ROMERO, F., Rodriguez-Moran, M., Paniagua- Sierra, JR., Garcia-Bulnes, G., Salas-Ramirez, M., Amato, D., Pentoxifylline reduces proteinuria in insulin-dependent and non insulin-dependent diabetic patients, Clin Nephrol, 43(2), 116-121, (1995).

GUNELI, E., Tugyan, K., Ozturk, H., Gumustekin, M., Cilaker, S., Uysal, N., Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats, Eur Surg Res, 40(4), 354-60, (2008).

HALLIWELL, B., Antioxidant characterization, Methodology and mechanism. Biochemical Pharmacology, 49(10), 1341-1348, (1995).

HASANOĞLU, E., Altan, N., Sindel, P., Ongun, CÖ., Bali, M., Altıntaş, E., The Relationship Between Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Plasma Levels of Some Trace Elements (Al,Cu,Zn) of Dialysis Patients, General Pharmacology, 25(1), 107-110, (1994).

KILIC, N., Malhatun, E., Elmalı, E., Altan, N., An Investigation into the Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione perioxidase activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Muscle Tissue, General Pharmacology, 30(3), 399-401, (1988).

LA VIGNERA, S., Condorelli, R., Vicari, E., D'Agata, R., Calogero, A.E., Diabetes Mellitus and Sperm Parameters. J. Androl. 33, 145–153, (2012)

LIN, SL., Chiang, WC., Chen, YM., Lai, CF., Tsai, TJ., Hsieh, BS., The renoprotective potential of pentoxifylline in chronic kidney disease, J Chin Med Assoc, 68(3), 99-105, (2005).

LIU, ZM., Zheng, XM., Yang, ZW., Li, SW., Protective effect of pentoxifylline on spermatogenesis following testicular torsion/detorsion in rats, Zhonghua Nan Ke Xue, 12(4), 323-5, 329, (2006).

MEYER, K., Deutscher, J., Anil, M., Berthold, A., Bartsch, Kiess, W., Serum androgen levels in adolescents with type I diabetes: relationship to pubertal stage and metabolic control, J Endocrinol Invest, 23, 362–368, (2000).

ÖZENİRLER, S., Tuncer, C., Ongun, CÖ., Altan, N., Kandilci, U., Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases, General Pharmacology, 25(7), 1349- 51, (1994).

PİTKANEN, OM., Martin, JM., Hallman, M., Akerblom, HK., Sariola, H., Andersson, SM., Free radical activity during development f insulin dependent diabetes mellitus in the rat, Life Science, 50(5), 335-339, (1992).

ROESSNER, C., Paasch, U., Kratzsch, J., Glander, H.J., Grunewald, S.. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. Reprod Biomed Online. 25(3),292-9, (2014).

SAINIO-POLLANEN, S., Henriksen, K., Parvinen, M., Simell, O., Pollanen, P., Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice, Int J Androl, 20, 243–253, (1997).

SAVAS, C., Dindar, H., Aras, T., Yücesan, S., Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion, Int Urol Nephrol, 33(1), 81-5, (2002).

SAXENA, AK., Srivastava, P., Kale, RK., Baquer, NZ., Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate, Biochemical Pharmacology, 45(3), 539-542, (1993).

SEXTON, WF., Jarow, JP., Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function, Urology, 47, 508–513, (1997).

TANG, XY., Zhang, Q., Dai, DZ., Ying, HJ., Wang, QJ., Dai, Y., Effects of strontium fructose 1,6-diphosphate on expression of apoptosis-related genes and oxidative stress in testes of diabetic rats, 15(3), 251-6, (2008).

VAN DAM, PS., Van Asbeck, BS., Erkelens, DW., Marx, JJ., Gispen, H., Bravenboer, B., The role of oxidative stress in neuropathy nd other diabetic complications, Diabetes Metabolism eviews, 11(3), 181-192, (1995).

YARDIM-AKAYDIN, S., Sepici, A., Özkan, Y., Şimşek, B., Sepici, V., Evaluation of allontoin levels as a new marker of oxidative tress in Behçet's disease, Scandinavian Journal of Rheumatology, 35(1), 61-64, (2006).

YARDIM-AKAYDIN, S., Sepici, A., Özkan, Y., Torun, M., Şimşek, B., Sepici, V., Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: s Allontoin a Marker of Oxidative Stress? Free Radical Research, 38(6), 623-628, (2004).