T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

ARI SÜTÜNÜN DİYABETİK SIÇAN TESTİS DOKULARINDAKİ APOPTOZ, PROLİFERASYON VE INSL3 İMMUNREAKTİVİTELERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Şirin YAVAŞ

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

ARI SÜTÜNÜN DİYABETİK SIÇAN TESTİS DOKULARINDAKİ APOPTOZ, PROLİFERASYON VE INSL3 İMMUNREAKTİVİTELERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Şirin YAVAŞ

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-2016/167

Tez No :

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof.Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Şirin YAVAŞ tarafından tez başlığı "Arı Sütünün Diyabetik Sıçan Testis Dokularındaki Apoptoz, Proliferasyon ve INSL3 İmmunreaktivitelerine Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin, tez savunma sınavı **…./…./…...** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdür V.

TEŞEKKÜR

Yetişmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen sevgili aileme minnettarım. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bana yardımcı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN başta olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR, Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmama maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonuna teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……...…….....**1**
GENEL BİLGİLER……...…….……..**3**
DİABETES MELLİTUS…….……...…..**3**
DENEYSEL DİYABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN…….....**5**
TESTİS HİSTOLOJİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ……..…..…….....**6**
İNSULİN BENZERİ FAKTÖR 3 (INSL3)……**9**
ARI SÜTÜ…..……...…….....**10**
GEREÇ VE YÖNTEMLER……...……...**14**
BULGULAR……...**19**
TARTIŞMA……**43**
SONUÇLAR……...**49**
ÖZET ..……...**51**
SUMMARY…….....**53**
KAYNAKLAR……...**55**
ŞEKİLLER LİSTESİ……..……..**63**
ÖZGEÇMİŞ……...**65**
EKLER……...

SİMGE VE KISALTMALAR

DM : Diabetes mellitus

DNA : Deoksiribonükleik asit

H+E : Hematoksilen + Eozin

INSL3 : Insulin-like factor 3

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PBS : Phosphate buffer saline

STZ : Streptozotosin

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling

β : Beta

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (Diyabet, Şeker hastalığı); dünya sağlığının en önemli göstergelerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütünün raporu ile Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı kapsamında hazırlanan rapora göre, dünyada diyabetik birey sayısının, 2030 yılında 438 milyon kişiyi bulacağı ön görülmüştür (1).

Günümüzde diyabetin önemli komplikasyonları arasında yer alan infertilite; hem kadın hem de erkeklerde yıllardır araştırılan, ancak hala karanlıkta kalmış pek çok yönü bulunan bir konudur. Deneysel diyabet oluşturulmuş erkek sıçanların testis dokularında görülen hücresel değişiklikler, diyabetli insan testis dokularında görülen değişiklikler ile neredeyse aynıdır. Diyabetin erkek bireylerde; libido, impotens, testosteron hormonu düzeyi, semen hacmi, testis ağırlığı, sperm sayı ve hareketliliğinde azalmaya sebep olduğu, ayrıca retrograd ejakülasyon, erektil disfonksiyonun yanı sıra, testis dokusunu oluşturan spermatogenik seri hücreleri, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve interstisyel bağ dokuda histolojik değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir (2-9). Yapılan çalışmalarda, diyabetik testiste apoptozisin arttığı ve bu nedenden dolayı da spermatogenezisde bozulmaların meydana geldiği, klinik ve deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur (6-8,10,11).

Diyabet patogenezinde ortaya çıkan hiperglisemi nedeniyle, serbest radikal oluşumu artmakta ve sonuç olarak oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalmasına veya bozulmasına neden olabilmektedir (12,13).

Arı sütü; işçi arıların hipofaringeal bezlerinden salgılanan önemli bir besindir. Yapısında; yaklaşık % 60-70 su, %10-12 karbonhidrat, %12-15 protein ve %3-7 lipid bulunmaktadır (14,15). Arı sütünün; insülin benzeri etkisiyle birlikte (15-17), antihipertansif, vazodilatatif (17), antitümoral, antioksidatif, antiinflamatuar ve immunmodülator (16-22) rolleri de gerçekleştirilen pek çok bilimsel araştırmayla ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, diyabetik bireylerde izlenen kan glukoz seviyelerindeki değişimler ve oksidatif stresi ortadan kaldırmak amacıyla; arı sütünün kan glukoz homeostazını düzenleyici ve antioksidan (15-17) özelliklerden yararlanılarak, seminifer tübüllerde ve Leydig hücrelerinde meydana gelen hormonal ve histopatolojik değişikliklere, özellikle insulin benzeri faktör 3 (INSL3) proteinine etkisinin araştırılması planlanmıştır. Böylece, arı sütü gibi oldukça etkin olduğu bilinen bir antioksidanın kullanılmasıyla, diyabetli erkek hastaların infertilite tedavisine yönelik katkı sağlanması ve INSL3'ün de, erkek subfertilite ve/veya infertilitesinin belirlenmesinde yeni bir parametre olarak gündeme gelmesinin sağlanması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus; pankreas dokusundaki beta (β) hücrelerinden salgılanan insülin sekresyonunun ve/veya insülinin aktivitesindeki yetersizlik sebebiyle meydana gelen kronik metabolik bir hastalıktır. En belirgin özelliği, kronik hiperglisemi olup; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozukluklara sebep olmaktadır (2,23-25).

Diabetes Mellitus Sınıflandırması

Diyabet patolojisinin sınıflandırması, Amerikan Diyabet Örgütü tarafından 2016 yılında; tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet tipleri olmak üzere 4 gruba ayrılnıştır (1,26).

Tip 1 diyabet: Bu tip diyabet, insülin bağımlı veya juvenil başlangıçlı diyabet olarak da isimlendirilmektedir. Tip 1 diyabetli hastalar, tüm diyabetik hastaların yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır. Pankreas dokusundaki β hücrelerinin, hücre aracılığı (T hücre) ile gerçekleşen oto-immün yıkımı sonucu ortaya çıkar. Pankreastaki β hücrelerinin yıkım oranı değişkenlik gösterir. Özellikle yetişkinlerde daha yavaş, bebeklerde ve çocuklarda ise hızlı olmaktadır (1,26).

Tip 1 diyabetik hastalar, kalıcı olarak insülinopeni taşırlar ve de ketoasidoza eğilimlidirler. Yetişkin hastalarda; yıllarca ketoasidoza karşı pankreatik β hücreleri fonksiyonlarını muhafaza edebilseler de; sonunda bu bireyler, hayatta kalabilmek için insüline bağımlı hale gelip, ketoasidoz riski taşırlar. Tip 1 diyabet tanısının önemli belirteçleri arasında; Glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD65), tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2β, çinko transporter 8 (ZnT8) otoantikorları bulunmaktadır (1,26).

Tip 2 diyabet: İnsülin bağımlı olmayan ya da yetişkin bireylerde başlangıç gösteren diyabet olarak isimlendirilmektedir. Dünyada en sık görülen diyabet tipidir ve diyabet hastalarının yaklaşık olarak %90-95'ini oluşturur. Genellikle 40-45 yaşından sonra meydana gelir ve yaş arttıkça görülme olasılığı da artmaktadır. Tip 2 diyabet; insülin direnci olan ve genellikle insülini yeterince salgılayamayan bireylerde görülür. İnsülin seviyeleri; normal ya da normalden biraz fazla olduğundan, hayatları boyunca insülin tedavisine ihtiyaçları olmayabilir (1,26,27).

Tip 2 diyabetik bireylerde ketoasidoz, nadiren spontan olarak görülmektedir. Genellikle bir başka hastalığın (enfeksiyon) stresine bağlı olarak ortaya çıkar. Bu tip diyabetik bireylerde hiperglisemi çok yavaş geliştiğinden, yıllarca diyabet tanısı konulmadan yaşamlarına devam ederler (26).

Gestasyonel diyabet: Bu tip diyabet; glukoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır. Toplumlara göre görülme oranı değişmekle birlikte bu oran genel olarak %1 ile %14 arasındadır. İlk kez gebelik esnasında görülen diyabet tipidir (26,28).

Gestasyonel diyabetin görülme sıklığını etkileyen en önemli faktörlerden biri, annenin yaşıdır. Yapılan çalışmalarda 25 yaş ve üstü anne adaylarının, bu tip diyabet için daha fazla risk taşıdığı gösterilmiştir. Ayrıca, ailede diyabet öyküsü olması, obezite ve önceki gebeliklerde gestasyonel diyabet tanısı alması da diğer risk faktörleridir (26,28).

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri: Pankreatik β hücre fonksiyonlarında defektler, genetik bozukluklar, insülin fonksiyonundaki bozukluklar, pankreas hastalıkları, endokrin hastalıklar, ilaç ve kimyasal maddelere maruz kalınması, çeşitli enfeksiyonlar sonucu meydana gelen diyabet tipidir. Diyabetik bireylerin yaklaşık olarak %1'lik bir kısmını kapsar (1,26).

DENEYSEL DİYABET MODELLERİ VE STREPTOZOTOSİN

Hastalıklardan korunmak ve hastalığın neden olduğu komplikasyonları araştırmak amacıyla, hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar uzun bir tarihe sahiptir. İlk olarak von Mering 1880'li yıllarda hipergliseminin oluşumuna ışık tutmuş ve Minkowski köpeklerde pankreatektomi uygulayarak, hiperglisemi mekanizmasını açıklamış ve ardından bu yöntem, sonraki yıllarda Hence tarafından sıçan ve farelerde de uygulanmıştır. Marjorie ise 1920 yılında pankreatektomi sonrasında, insülini izole etmeyi başarmış ve deneysel çalışmalarda önemli bir yol katetmiştir. Banting ve Best ise 1921'de yaptıkları çalışmalarında, pankreas dokusunda yer alan Langerhans adacıklarından insülinin salındığını ispat etmişlerdir. Bu çalışmaların ışığında cerrahi yöntemler haricinde, β hücrelerinde tahribat yaratmak kaydıyla diyabet modelleri oluşturulmaya başlanmıştır (29,30).

Tarihsel süreçte deneysel diyabet modelleri oluşturmak için kullanılan kimyasal ajanlar; streptozotosin (STZ), alloksan, rodentisid-Vacor, çinko şelatörleri, diyet nitrozaminleri olarak sıralanabilirler. Bunlardan günümüzde en çok tercih edilenleri, streptozotosin ve alloksandır (29,30).

STZ, *Streptomycetes achromogenes'*den elde edilmekte olup, hem tip 1 diyabette hem de tip 2 diyabette model oluşturmak amaçlı kullanılmaktadır. Diyabetojenik etkisinin yanında, antineoplastik, antibiyotik özellikleri de bulunmaktadır. Etki mekanizması; yapısında mevcut olan glukoz moleküllerinin, β hücrelerinde bulunan glukoreseptörlere (GLUT2) bağlanması ve hücre içine girmesi ile başlamaktadır. STZ'nin; pankreatik β hücrelerinin, glukoza karşı gösterdiği ilgiyi ortadan kaldırdığı için hiperglisemiye neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca STZ, β hücrelerinin DNA'sına zarar verdiğinden, kalıcı hasara neden olmaktadır. STZ'nin diyabetojenik etkilerine karşı, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve poli ADP-riboz polimeraz (PARP) inhibitörleri koruyucu olarak kullanılırlar (29,30).

Streptozotosin uygulandıktan sonra; üç fazdan oluşan, biyokimyasal bir değişim süreci başlamaktadır. Bu fazlar;

Geçici hiperglisemi fazı: STZ enjekte edildikten, ortalama bir saat sonra başlayıp, yaklaşık olarak 2-4 saat süren, insülin salgısının durması ve karaciğerde glikojen yıkımından dolayı ortaya çıkan fazdır.

Hipoglisemik faz: STZ enjeksiyonunu takiben, 4-8 saat sonra görülmeye başlamaktadır. Pankreatik β hücrelerinin nekrozu sonucunda, kanda aşırı dozda insülinin bulunduğu faz olarak bilinmektedir. STZ uygulandıktan sonra ilk 24 saatlik dönemde gözlenen denek kayıpları, genellikle bu fazda gerçekleşmektedir.

Kalıcı hiperglisemi fazı: STZ enjeksiyonundan 12-48 saat sonra ortaya çıkan fazdır. β hücre nekrozu sonucunda, kanda miktarı artan insülin kullanılır, sonrasında insülin miktarı düşer ve hiperglisemi tablosu meydana gelir. Bu fazın devamlılığıyla, deneklerde diyabetin semptom ve komplikasyonları ortaya çıkmaktadır (29,30).

TESTİS HİSTOLOJİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ

Testis; hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonu olan bir dokudur. Ekzokrin fonksiyonunu, sperm üretimi yaparak, endokrin fonksiyonunu ise başlıca testosteron üretimi yaparak gerçekleştirmektedir. Erkekte esas üreme organıdır ve skrotum denilen kesenin içinde iki adet olarak bulunurlar. Yetişkin erkekte her bir testis, yanlardan basık oval şekilde olup, 4-5 cm uzunluğa, 2,5-3 cm genişliğe ve 2- 2,5 cm derinliğe sahiptir (31,32).

Epiblasttan kökenlenen primordial germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederek 3. haftada umbilikal vezikülün (vitellus kesesi) allantoise yakın olan duvarındaki, endoderm hücreleri arasına yerleşirler. 4. haftada son bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, gonadal kabartılara göç ederler ve 6. haftada gonadal kordonlara katılırlar (33,34). Spermatogonyumlar, primordiyal germ hücrelerini oluştururken; mezodermden Sertoli, Leydig (interstisyel hücreler) ve myoid (peritübüler kontraktil hücreler) hücreler gelişirler (32,35,36).

Genetik olarak XY kromozomuna sahip embriyoda bulunan primordial germ hücreleri, Y kromozomu üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici gen (SRY)'in transkripsiyon faktörünün etkisiyle, testis belirleyici faktör (TDF) kodlanarak, primitif cinsiyet kordonlarını yani medullar kordonları oluşturmak üzere prolifere olmaya devam ederler. Testiküler tayin için gerekli olan bir başka etken ise transkripsiyon düzenleyicisi olan SRY-box 9 (SOX9)'un ekspresyonudur (33,34).

Testisler; vücut boşluğu dışında bulunan skrotumun içinde, bir çift olarak yer almaktadır. Testislerin etrafı dıştan içeriye doğru sırasıyla; Tunica vajinalis, Tunica albuginea ve Tunica vaskülosa tabakalarından oluşan bir kapsülle çevrilidir. Tunica vajinalis; testislerin

abdominal kaviteden, skrotuma göç ederken sürükledikleri periton tabakasıdır. Bu tabaka mezotel ile döşeli olup, testisin anterolateral yüzeyinde bulunur. Tunica albuginea; fibroelastik bağ dokusu yapısındadır, testisin en kalın ve en belirgin tabakasıdır. Bu tabaka, testisin arka yüzünde kalınlaşıp "mediyastinum testis" adı verilen yapıyı oluşturur. Kan ve lenf damarları, testise giriş ve çıkışta mediyastinum testis kısmından geçerler. Tunica vaskülosa ise kan damarlarından zengin, gevşek bağ dokusu karakterindedir. Kapsülden testisin içine doğru ilerleyen ince bağ doku uzantıları, testisi sayıları yaklaşık 250 civarlarında olan lobüllere ayırır. Bu lobüllerin her birinde; sperm üretiminin yapıldığı, 1-4 adet "tubulus seminiferous contortus (seminifer tübül)" bulunur. Seminifer tübüllerin etrafınında ise; Leydig (interstisyel) hücreleri, kan damarları ve sinir lifleri içeren gevşek bağ dokusu yer alır (32). Leydig hücreleri; büyük ve poligonal şekilli olup, interstisyel alanda bulunurlar. Testosteron salgılayan bu hücreler; granülsüz endoplazmik retikulum, tübüloveziküler kristalı mitokondriyon ve lipid damlacıkları içerirler. Testosteron ise erkek fetusun gonadlarının gelişimi, sperm üretiminin başlaması, aksesuar bezlerin sekresyona başlaması, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumludur (35,36).

Seminifer tübüllerin her biri; 30-70 cm uzunluğunda ve 150-250 μm çapındadır. Her tübül, bazal membranını saran hafif kasılma özelliği gösteren "myoid hücreler"den ve bazal membran üzerine yerleşmiş, çok katlı germinal epitelden oluşur. Germinal epitel, temel olarak Sertoli hücreleri (sustantekular) ve spermatogenik seri hücrelerinden meydana gelir (32,35,36).

Sertoli hücreleri; germinal epitel bazal membranına oturmuş ve apikal kısımları tübül lümenine kadar uzanan, prizmatik şekilli hücrelerdir. Hücre yapısı incelendiğinde; tipik olarak üçgen ya da oval şekilli nükleuslara, bol miktarda mitokondriye, iyi gelişmiş Golgi komplekslerine, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulumlara ve lizozomlara sahip olduğu gözlenir. Spermatogenik seri hücrelerini destekleyen, besleyen ve koruyan Sertoli hücreleri, puberteden sonra bölünme yeteneklerini kaybederler (32,35,36).

Seminifer tübül epitelini oluşturan bir diğer hücre popülasyonu, spermatogenik seri hücreleridir. Sertoli hücreleri arasında bulunan bu hücreler, sırasıyla; bazal membran üzerine oturan spermatogonyumlar, spermatositler (spermatosit I, spermatosit II) ve spermatidlerdir. Bu hücrelerin gelişimleri sonucunda olgun spermler meydana gelir. Bu süreç "spermatogenez" olarak adlandırılır ve 3 farklı aşamadan oluşur (35,36).

Birinci faz; spermatogonyal faz olup, spermatogonyumların mitoz bölünme geçirerek, prolifere olmasıyla başlar. Spermatogonyumların, nükleus özelliklerine göre üç tipi tanımlanmıştır. Tip A koyu spermatogonyumlar; bazofilik nükleusa sahip olup, bu hücrelerin spermatogonyumları oluşturan kök hücre olduğu düşünülmektedir. Mitoz bölünme geçirmesiyle ya kök hücre olarak kalırlar ya da Tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar; mitoz bölünme geçirerek, Tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar ise; yuvarlak nükleusludurlar ve mitoz bölünme geçirerek, "primer spermatositleri (spermatosit I)" meydana getirirler (32,35).

Spermatosit fazı; spermatosit 1'ler mayoz bölünmeye geçmeden önce, DNA' larını iki katına çıkartarak, 2n kromozom ve 4d DNA' ya sahip olurlar. Birinci mayoz bölünmelerini geçirdiklerinde; hem kromozom sayıları, hem de DNA miktarları yarıya düşer, n kromozomlu 2d DNA'lı "sekonder spermatosit (spermatosit II)"leri oluştururlar. Oluşan spermatosit II'ler; DNA'larını iki katına çıkartmaksızın, ikinci mayoz bölünmeye girerler ve bölünme sonunda n kromozomlu, d DNA'lı "spermatidleri" meydana getirirler (32,35).

Spermatid fazda; spermatidler olgun sperm haline gelebilmek için "spermiyohistogenez" olarak adlandırılan bir değişim sürecine girerler. Bu değişim süreci 4 aşamadan meydana gelmektedir;

Golgi dönemi: PAS (+) reaksiyon veren, proakrozomal granüllerin biriktiği ve çok sayıda Golgi kompleksinin bulunduğu bu dönemde; proakrozomal granüller, akrozomal veziküllerle birleşerek, gelişen sperm hücresinin ön kutbunu belirler. Ayrıca bu dönemde sentriyoller, akrozomun tersi yönünde hareket ederek, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturmaya başlarlar.

Kep (Şapka) dönemi: Nükleusun ön bölümünü akrozomal vezikül kaplamış olup, nükleus membranının bu yöne bakan kısmındaki membran kalınlaşmış ve porları yok olmuştur.

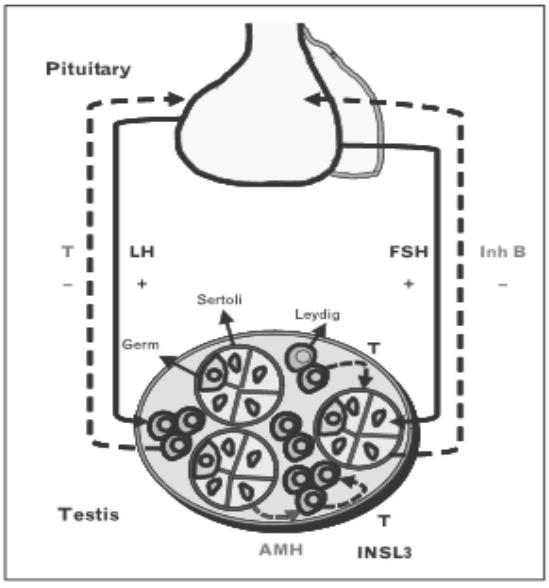
Akrozomal dönem: Spermin başı, Sertoli sitoplazmasının içine gömülüdür ve spermin kuyruğu, tübül lümeninde belirmeye başlar. Nükleus eliptik bir şekil alır ve akrozom, plazma membranın apikal yüzeyine iyice yaklaşır. Sitoplazma içinde bulunan mikrotübüller, akrozomdan başlayıp, spermatidin arka kutbuna doğru ilerleyerek, manşet (silindirik kılıf) adı verilen yapıyı oluştururlar.

Olgunlaşma dönemi: Spermatidlerin fazla sitoplazmaları boğumlanıp, kopar ve bu artık sitoplazma, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Ayrıca bu dönemde, spermatidlerin birbirleriyle olan bağlantıları kaybolur ve Sertoli hücreleriyle olan bağlantılarıda yıkılır (spermiasyon) ve olgun spermlerin seminifer tübülü lümenine düştüğü gözlenir (32,35,36).

İNSULİN BENZERİ FAKTÖR 3 (INSL3)

Leydig hücre fonksiyonunun bir göstergesi olan testosteron düzeylerinin yanı sıra, son yıllarda INSL3; yeni bir biyobelirteç olarak dikkat çekmektedir (37-41). INSL3; yetişkin erkeklerde, Leydig hücrelerinin fonksiyonel kapasitesi hakkında bilgi veren önemli bir parametredir. Sağlıklı erkek bireylerin yaşları ilerledikçe, INSL3 düzeylerinde azalma meydana gelmektedir (39).

Hipofizden salınan, luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH), testis dokusundaki belirli hücreler üzerine etki göstermektedirler (Şekil 1). LH etkisi ile Leydig hücrelerinin, testosteron sentezi indüklenmektedir. Testosteron ise, testis dokusu içinde otokrin regülatör, komşu Sertoli hücrelerinde ise parakrin faktör gibi davranmaktadır (40).



Şekil 1. Hipofiz-testis ekseni (40).

Leydig hücreleri aynı zamanda, INSL3 salgılamaktadır. INSL3, insülin relaksin ailesinin bir üyesidir (38). Pek çok memeli türünün testislerinde, fazla miktarda salgılanan bir transkript dizisi olarak keşfedilmiştir (39). Varlığı ve etkileri 1990'lı yıllarda keşfedilen

INSL3'ün, gubernaküler büyümedeki transabdominal fazda önemli düzenleyici görevi vardır. INSL3'ün reseptörü; relaksin ailesi peptid reseptör 2 olarak bilinir (LGR8). INSL3 geninde meydana gelen mutasyonların, kriptorşidizme (inmemiş testis) yol açtığı bilinmektedir. Prenatal dönemdeki testiküler inişin, ilk fazında oldukça etkendir. Erkek bebeklerde kriptorşidizm ile ilgili olarak, INSL3 düzeyleri önem taşımaktadır. Ayrıca INSL3, nöral gelişim ile ilgili genlerin ekspresyonunu da etkilemektedir (42).

ARI SÜTÜ

İlk kez 1623 yılında, sadece kraliçe arı için üretildiği ve arılardan elde edilen ürünler arasında **(**Şekil 2), en zengin besin maddesi olarak keşfedilmiştir. İngilizce'de önce krallara özgü anlamında "Gelatine Reale" adı kullanılmış olsa da, daha sonra ise "Royal Jelly-Arı sütü" adı verilmiştir (43).



Şekil 2. Bal peteği içine salgılanan arı sütü (44).

Arı Sütünün Tanımı

Genç işçi (5-15 günlük yaştaki) arıların, hipofaringeal ve mandibular bezlerinden sekrete edilen bir üründür. Kraliçe arı ve işçi arı arasındaki farklılaşma, larval dönem süresince yapılan beslenmeyle ilişkilidir. Döllenmiş arı yumurtalarının tamamı, ilk dört gün boyunca, arı sütüyle beslenir ve tümünden kraliçe arı gelişebilir. Ancak, sadece larval gelişim döneminin tamamında arı sütü ile beslenenlerden, kraliçe arı oluşmaktadır (45). Bu beslenme

durumundan dolayı, kraliçe arı ile işçi arılar, arasında birçok açıdan önemli farklılıklar gözlenmektedir. Bunlar:

Morfolojik gelişimleri: Arı sütü ile beslenerek, larval dönemlerini tamamlayan kraliçe arıların, üreme organları iyi gelişirken; işçi arıların, kovanda yapılan işlerle ilgili olarak polen sepeti, mandibulaları, kuluçka salgı bezi ve balmumu salgı bezleri gibi organları iyi gelişmiştir.

Yaşam süreleri: Kraliçe arılar birkaç yıl yaşayabilirken, işçi arılar sadece birkaç ay yaşayabilirler. Ayrıca larval dönemlerindeki yaşam süreleri de, birbirinden farklılık göstermektedir; kraliçe arıların bu dönemi 15,5 gün iken, işçi arılar 21 günde bu aşamayı tamamlamaktadır.

Davranış farkları: Kraliçe arılar; günde birkaç bin adet yumurta bırakırlarken, işçi arılar ara sıra yumurta bırakırlar. Kraliçe arılar kovanla ilgi aktivitelere katılmazken, işçi arılar kovan ile ilgili ortak faaliyetlere katılırlar (46).

Arı Sütünün Fiziksel Özellikleri

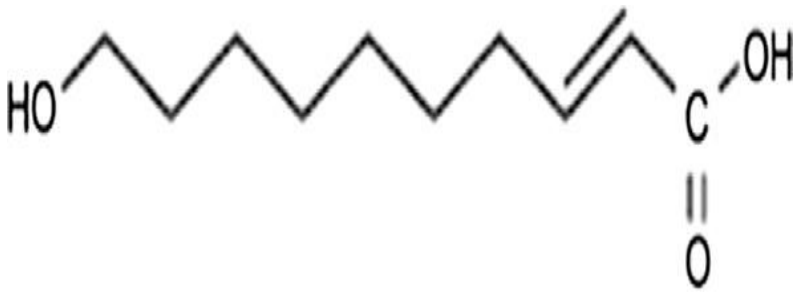
Arı sütü; beyazımsı, kemik renginde olup, zamanla sarımtırak renge dönüşen, homojen karaktere sahip ve kremsi kıvamdadır. Kendine has kokusuyla, yakıcı-ekşimsi bir lezzete, yaklaşık 1,1 g / cm^3 özgül ağırlığa (yoğunluk) sahiptir ve su da kolaylıkla çözünebilen karakterdedir (46,47).

Arı sütünü saklanma koşulları değiştiğinde, fiziksel özelliklerinde de değişim olabilir. Mesela 5 °C'de saklanan arı sütündeki renk ve viskozite, oda sıcaklığında saklanan arı sütünden farklıdır. Ancak -40 °C'de saklanan arı sütünde, değişim gözlenmemiştir (48).

Arı Sütünün Kimyasal Özellikleri

Arı sütünün temel bileşenlerini; su, proteinler, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler ve mineraller oluşturmaktadır. Bu maddelerin arı sütünde bulunma oranları ise; % 60-70 oranında su, % 12-15 oranında protein, % 10-12 oranında karbonhidrat, % 3-7 oranında lipid, % 0,5-2 oranında esansiyal aminoasitler, % 0,8-4 oranında tanımlanamayan maddeler bulunmaktadır (14,15,45). İçinde barındırdığı biyolojik aktiviteye sahip vitaminlere; tiamin, niasin, riboflavin gibi pek çok örnek verilebilir (49,50). Ayrıca arı sütünün içinde; kalsiyum, potasyum, sodyum, demir gibi mineraller bulunmaktadır (50).

Arı sütünün temel bileşenlerinden olan 10-hidroksi-2-dekenoik asit (10 HDA), arı sütünün kalitesini belirleyen bir yağ asididir (Şekil 3). Türk Standartları Enstitüsü (TSE)'ne göre arı sütünde, en az % 1,40 oranında 10-HDA bulunmalıdır (51).



Şekil 3. 10-HDA kimyasal yapısı (52).

Arı sütünde bulunan 10-hidroksi-2-dekenoik asit; *Micrococcus pyogenes, Escherichia coli* gibi pek çok bakteriye ve mantara karşı antibiyotik aktivite sergilemektedir (53,54).

Arı Sütünün Fertilite Üzerine Etkileri

Abdelhafiz ve Muhamad'in (55) 2008 yılında yaptıkları çalışmada; erkeklerde astenozoospermiye (ileri hızlı sperm oranının referans değerinin altında olması) bağlı infertilitede, bal ve arı sütünün tedavi edici olumlu etkileri araştırılmıştır. Arı sütünün erkek bireylerde, sperm sayısını arttırdığı yönündeki bulgular, Karacal ve ark. (56)'nın 2006 yılında yaptıkları çalışma ile de benzerlik göstermektedir.

Hassan (57)'ın 2009 yılında yaptığı çalışmada, erkek ratlara 1 g/kg arı sütü uygulanmasıyla; testesteron düzeyi, sperm sayısı/canlı sperm oranının anlamlı derecede arttığı, sperm anormali yüzdesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirtilmiştir.

Elnagar (58) ise erkek tavşanlarda sıcaklık stresine bağlı infertiliteyi önlemek amacıyla arı sütünü kullanılmıştır. Değişik dozlarda (200, 400, 800 mg/kg) arı sütü verilen tavşanlar ile oluşturulan gruplarda; kontrol grubuna göre, sperm motiliteleri, ejekulat hacmi, sperma konsantrasyonu, seminal plazmanın içerdiği fruktoz oranı ve testesteron düzeylerinin artığı ileri sürülmüştür. 200, 400, 800 mg/kg arı sütü verilen gruplarda sırasıyla, anormal spermlerin %24, %24, %15 ve ölü spermlerin %27, %25, %17 oranlarında olduğu, yani istatistiksel anlamlılıkla, bu değerlerde arı sütünün azaltıcı yönde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Karaca ve ark. (8); diyabetik sıçanlara 400 mg/kg/gün dozda arı sütü verdikleri çalışmada; diyabet grubuna göre, deneysel diyabet oluşturulduktan sonra arı sütü verilen grupta, deneklerin vücut, testis ağırlıkları ve serum testosteron düzeylerinin anlamlı artış gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Ghanbari ve ark. (14) ise diyabetik sıçanlara 6 hafta süresince 100 mg/kg dozda arı sütü uygulanmasının; testiküler ağırlığı, sperm sayı ve motilitesini, sperm canlılığını ve testosteron düzeylerini arttırdığını tespit etmişlerdir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunulmuş ve 2016.07.04 nolu karar ile onay alınmıştır (Ek 1). Etik kurul onayının ardından, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAP) maddi destek için başvurulmuş ve 2016/167 no'lu proje olarak desteklenmesine karar verilmiştir.

Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden, 3 aylık, ağırlıkları 280-340 gr arasında değişen 30 adet *Wistar albino* erkek sıçan temin edilmiştir. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip olan deneklerimiz; deney süresince, stabil laboratuvar koşulları altında tutulmuş (22±1 ^{0}C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda), günlük içme suyu ile birlikte ham %21 protein içeren pelet yemlerle (Purina, Bursa, Türkiye) beslenmiştir.

Deneklerimizden;

1. Grup: Kontrol grubu; sitrat tamponu (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık) intraperitoneal + steril su, intragastrik verilen grup (n=6),
2. Grup: Diyabet grubu; 50 mg/kg STZ tek doz, intraperitoneal (sitrat tamponunda çözülerek) verilen grup (n=8),
3. Grup: 50 mg/kg STZ tek doz, intraperitoneal + 400 mg/kg/gün intragastrik arı sütü (steril suda seyreltilerek, diyabet oluşturulduktan sonra, 4 hafta boyunca) verilen grup (n=6) olmak üzere üç farklı grup oluşturulmuştur.

Diyabet oluşturmak için kullandığımız STZ (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya)'nin stabilitesini koruduğu ve iyi çözündüğü bir solüsyon olan sitrat tamponu, steril enjeksiyonluk su ile hazırladıktan sonra pH'ı 4.2'ye ayarlanmıştır. STZ, sitrat tamponunda çözüldükten hemen sonra deneklere uygulanmıştır.

Deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinden, kan glukoz düzeylerine; başlangıçta, STZ verilmesini takiben model oluşumunu gözlemek için 48 saat sonra ve deney sonuna kadar her hafta glukometre (IME-DC, Hof, Almanya) ile bakılmıştır. STZ uygulandıktan sonra, kan glukoz değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler, "diyabetik" olarak kabul edilmişlerdir. Vücut ağırlıkları ise deneyin başlangıcından, sonuna kadar her hafta ölçülmüştür.

Tüm deneklerin, planlanan bir aylık deney süresinin sonunda, ketasol (Ricterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, sağ ve sol testis dokuları total olarak çıkarılmış, ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskobik ve immünohistokimyasal çalışmalar için işlemlendirilmiştir.

IŞIK MİKROSKOBİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Işık mikroskobik rutin boyamalar ve immünohistokimyasal incelemeler için; testis doku örnekleri, %10'luk formaldehitle fikse edildikten sonra, dokular yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçilmiştir. Dehidratasyon aşamasından sonra, saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile muamele edilmiş, önce yumuşak parafin (Merck Millipore) ve sonrasında sert parafine (Merck Millipore) alınarak, parafin bloklar elde edilmiştir. Dokulardan histolojik ve morfometrik analizler için alınan 5 μm kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak hematoksilen+eozin (H+E) boyası uygulanmıştır. Entellan ile kapatılarak, daimi preparat haline getirildikten sonra, Olympus BX-51 mikroskobunda incelenerek, farklı büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir.

İn situ DNA uç işaretleme metodu- terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) tekniğinin uygulanması ve immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için; 5 μm kalınlığındaki testis kesitleri, poli-L-lisin kaplı lamlara alınmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda immünohistokimyasal işlemler uygulanmıştır.

Hematoksilen+Eozin Boyama Prosedürü

Parafin bloklardan aldığımız 5 μm kalınlığındaki kesitler, parafini uzaklaştırmak için 30 dk. boyunca toluol ile muamele edildikten sonra, sırasıyla %100, %96, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirip suya indirilmiştir. Kesitlere, 10 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (Merck Millipore) boyası uygulanmış, morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dk. bekletilmişlerdir. Daha sonra sitoplazma boyaması için Eozin (Merck Millipore) boyasında 1 dk. muamele edilmişlerdir. Dehidratasyon işlemi için; artan derecelerdeki alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) geçirilen kesitler, sonrasında 30 dk. toluol ile muamele edilmiş ve entellan (MerckMillipore) ile daimi preparat haline getirilmişlerdir.

TUNEL Prosedürü

Bu çalışmada, apoptozisin belirlenmesi amacıyla TUNEL tekniğinden yararlanılmıştır. Bu amaçla; 5 μm kalınlığında alınan kesitler, bir gece 37°C'lik etüvde bekletilmiş ve ardından oda ısısında 5 dk soğumaya bırakılmıştır. Deparafinizasyon işlemi için toluol ve dehidratasyon işlemi için alkol serilerinden geçirilen kesitler, daha sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH 7.4, Invitrogen, Californiya, ABD) ile yıkanmıştır. Proteinlerin sindirilmesi için, proteinaz K solüsyonu (Merck Millipore) ile muamele edilen kesitler, ardından distile sudan geçirilmiştir. Bundan sonraki aşamalar üretici firmanın önerileri doğrultusunda, ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon SA. Merck Millipore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca; endojen peroksidazların bloke edilmesi için kesitler, %3'lük H_2O_2'e alınmış ve daha sonra kesitler dengeleme tamponu ile oda ısısında 30 dk. bekletilmiş, ardından sırasıyla terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt) enzimi, durdurma/yıkama tamponu ve anti-digoxigenin peroksidaz ile muamele edildikten sonra, 3,3'-diaminobenzidine tetrahidroklorid dihidrate (DAB) kullanılarak kromojenize edilen kesitlere, hematoksilen zıt boyaması uygulanmıştır. Yükselen alkol serilerinden ve toluolden geçirilen kesitler, entellan (Merck Millipore) yardımı ile kapatılarak, daimi preparat haline getirilmişlerdir.

İmmünohistokimya Prosedürü

Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) ve insülin benzeri peptid-3 (INSL3) antikorlarının aktivitelerini immünohistokimyasal olarak değerlendirmek için; 5μm kalınlığındaki parafin kesitler, poli-L-lisin kaplı lamlara alınıp 56^oC'de bir gece bekletilmiş ve deparafinizasyon işleminden sonra, azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir.

Antijen geri kazanımı işlemi için kesitler, özel şalelere alınıp pH=6.0 olan sitrat buffer solüsyonu ile mikrodalga fırında (Vestel, 1550) maksimum konumunda 4 kez 5'er dakika inkübe edilmiştir. Oda ısısında soğutulan kesitler, sonra pH 7,2-7,4 olan 0,01M'lik phosphate buffer saline (PBS)'de 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için su ile hazırlanan %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksid) solüsyonu içinde 5 dakika bekletilmiş, PBS ile 3 kez 5'er dakika tekrar yıkanmıştır. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1'lik preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB, ABD) 5 dakika süreyle uygulanmasının ardından, bu serum uzaklaştırılmış, antikor dilüe etme solüsyonuyla (Invitrogen) hazırlanan tavşan monoklonal PCNA antikoru (1/16.000 dilusyonda, oda ısısında 1 saat, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, ABD) ve tavşan poliklonal INSL3 antikorlarında (1/500 dilusyonda, gece boyunca $+4^oC$ Novus Biologicals, Kolorado, ABD) inkübe edilmişlerdir. Negatif kontrol kesitleri, primer antikor yerine PBS ile muamele edilmiştir. Tüm kesitler bu aşamadan sonra, primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen) 10'ar dakika ve son olarak HRP-streptavidin (Invitrogen) ile oda ısısında muamele edilmişlerdir. DAB (Invitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilen ile zıt boyama yapılmış ve entellanla kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskobunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

HÜCRE SAYIMI VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Hazırladığımız preparatlardan H+E boyası uygulananlar kullanarak, tüm deneklerin testis doku örneklerinde seminifer tübül çaplarının ölçümü; X200'lik büyütmede, oküler mikrometreyle yuvarlak veya yuvarlağa yakın, her preparatta rastgele seçilen 10 tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir.

TUNEL tekniği uygulanan her bir testis kesitinde yer alan, ortalama 100 seminifer tübülde; en az 3 ve daha fazla apoptotik hücre bulunduran seminifer tübüller sayılarak "apoptotik tübül indeksi" ve seminifer tübüllerde yer alan ortalama 1000 hücredeki (3 veya 4 seminifer tübül), apoptotik hücreler sayılarak da "apoptotik hücre indeksi" hesaplanmıştır.

Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) uygulanan preparatlarda; ortalama 1000 adet hücrede (3 veya 4 seminifer tübül), PCNA ile pozitif reaksiyon verenleri sayılarak, proliferasyon indeksi hesaplanmıştır.

INSL3 preparatlarının skorlaması ise; her bir testis kesitinde 10 farklı İnterstisyel sahanın mm^2 olarak ölçümü yapılmış, bu alanlardaki pozitif reaksiyon veren hücreler sayılmış ve 1 mm^2 alandaki hücre sayısı hesaplanarak, skorlama tamamlanmştır.

İstatistiksel analizler; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanılarak yapılmış ve sonuçlar Ortalama ± Standart Sapma olarak gösterilmiştir. Niceliksel verilerin normal dağılıma uygunluğu, tek örneklem Kolmogorov Smirnov testi ile incelenmiştir. Grupların normal dağılan niceliksel değerlerinin karşılaştırılmasında ise tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arası farkı ortaya koymak için, grup varyanslarının homojen olması durumunda Tukey, heterojen olması durumunda Tamhane çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Gruplardaki başlangıç ve deney sonu; ağırlık ve kan glukoz değişimlerinin karşılaştırılmasında eşleştirilmiş t testi kullanılmıştır.

BULGULAR

KAN GLUKOZ, TESTOSTERON DÜZEYİ VE AĞIRLIK BULGULARI

Kontrol, diyabet ve arı sütü gruplarının; kan glukoz düzeyleri, deneye başlamadan önce ve deney süresince her hafta kayıt edilmiştir. STZ verildikten sonraki 48. saatte, kan glukoz düzeyleri yeniden ölçülmüş ve 250 mg/dl'nin üzerinde olan tüm denekler, diyabetik olarak kabul edilmişlerdir ve deney süresince, kan glukoz düzeyleri bu şekilde izlenmiştir. Ayrıca deneklerin vücut ağırlıkları, deneyin başlangıcında ve sonrasında her hafta ölçülmüştür. Testis ağırlıkları ise deneyin sonunda alınmıştır. Elde edilen veriler, Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Denekler sakrifiye edilmeden hemen önce ölçülen kan glukoz değerleri; diyabet grubu ve arı sütü grubunda, kontrol grubundaki deneklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir ($P<0.001$; Tablo 1). Ayrıca; diyabet ve arı sütü grupları arasında son kan glukoz değeri anlamlı olarak artış göstermiştir ($P=0.002$; Tablo 1).

Deneklerin kan örnekleri; kardiyak ponksiyon ile alınmış, santrifüj edilerek serumları elde edilmiştir. Kan serumlarında testosteron düzeylerine bakılmış ve ortaya çıkan istatistiksel sonuçlara göre; diyabet grubu ve arı sütü gruplarındaki deneklerin, kontrol grubundaki deneklere göre testosteron düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($P=0.002$; Tablo 1) gözlenirken, arı sütü ve diyabet grubu deneklerinin testosteron düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=0.686$; Tablo 1).

Tablo 1. Kan glukoz ve testosteron düzeyi değerleri

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=8)	Arı Sütü Grubu (n=6)	Gruplar Arası P
İlk kan glukoz değeri (mg/dl)	105.83 ± 8.280 (99-120)	94.00 ± 3.464 (90-99)	97.33 ± 4.131 (93-102)	
Son kan glukoz değeri (mg/dl)	108.67 ± 6.154 (101-116)	501.00 ± 22.984 (456-525)	544.67 ± 23.712 (522-586)	
P		**<0.001***	**<0.001*** **0.002†**	**<0.001**
Testosteron Düzeyi (ng/ml)	143.13±38.277 (88.24-202.88)	34.08±7.815 (22.43-47.03)	39.46±10.540 (31.98-60.43)	
P		**0.002***	**0.002*** 0.686†	**<0.001**

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

Gruplar oluşturulurken denekler rastgele gruplanmasına rağmen; kontrol, diyabet ve arı sütü grupları arasında ilk ağırlık verileri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Sakrifikasyon öncesinde ölçülen, son ağırlıklarının ise diyabet ve arı sütü gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (P<0.001 ve P=0.002; Tablo 2). Diyabet grubu ve arı sütü gruplarının son ağırlık verilerine bakıldığında, anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (P=0.255; Tablo 2).

Tablo 2. Vücut ve testis ağırlık değerleri

	Kontrol Grubu (n=6)	Diyabet Grubu (n=8)	Arı Sütü Grubu (n=6)	Gruplar Arası P
İlk ağırlık (gr)	314.50 ± 20.560 (290-340)	305.63 ± 15.547 (280-325)	307.83 ± 13.615 (286-323)	
		0.596*	0.771* 0.967†	0.613
Son ağırlık (gr)	328.50 ± 18.163 (306-351)	214.88 ± 4.518 (209-221)	243.83 ± 34.284 (205-293)	
		<0.001*	**0.002*** 0.255†	**<0.001**
Testis ağırlık (gr)	1.35 ± 0.120 (1.23-1.56)	1.16 ± 0.084 (1.03-1.27)	1.33 ± 0.151 (1.11-1.47)	
		0.018*	0.904* **0.044†**	**0.012**

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

Sakrifiye edilen deneklerin testis ağırlıkları ölçüldüğünde ise diyabet grubu deneklerinde, kontrol grubundaki deneklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (P=0.018; Tablo 2). Arı sütü grubu ve kontrol grubu testis ağırlıkları arasında bir farklılık bulunmazken (P=0.904; Tablo 2), arı sütü ve diyabet grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (P=0.044; Tablo 2).

MORFOMETRİK BULGULAR

Kontrol, diyabet ve arı sütü grubu deneklerinin seminifer tübül çapları incelendiğinde; diyabet ve arı sütü grubu deneklerinin seminifer tübül çapları, kontrol grubu deneklerinin değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla P<0.001, P<0.001; Tablo 3). Ayrıca; arı sütü grubunun, diyabet grubuna göre seminifer tübül çapları anlamlı olarak artış göstermiştir (P<0.001; Tablo 3).

Deneklerin testis uzunluk ölçümleri karşılaştırıldığında; testis uzunluklarının diyabet grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (P=0.003; Tablo 3). Ancak arı sütü grubu testis uzunluk ölçüleri, kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir (P=0.596; Tablo 3).

Tablo 3. Seminifer tübül çapı, testis uzunluk ve genişlik değerleri

	Kontrol Grubu (n=6)	**Diyabet Grubu (n=8)**	**Arı Sütü Grubu (n=6)**	**Gruplar Arası P**
Seminifer tübül çapı (µm)	316.00 ± 3.688 (311-321)	254.63 ± 1.996 (252-258)	290.67 ± 3.983 (286-298)	
P		**<0.001***	**<0.001*** **<0.001†**	**<0.001**
Testis Uzunluğu (cm)	1.85 ± 0.084 (1.8-2.0)	1.73 ± 0.046 (1.7-1.8)	1.82 ± 0.041 (1.8-1.9)	
P		**0.003***	0.596* **0.026†**	**0.003**
Testis Genişliği (cm)	1.10 ± 0.894 (1.0-1.2)	0.83 ± 0.116 (0.7-1.0)	0.75 ± 0.055 (0.7-0.8)	
P		**<0.001***	**<0.001*** 0.326†	**<0.001**

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

Testis genişlikleri karşılaştırıldığında ise; diyabet ve arı sütü grupları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterirken (P<0.001; Tablo 3), kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (P=0.326; Tablo 3).

MORFOLOJİK BULGULAR

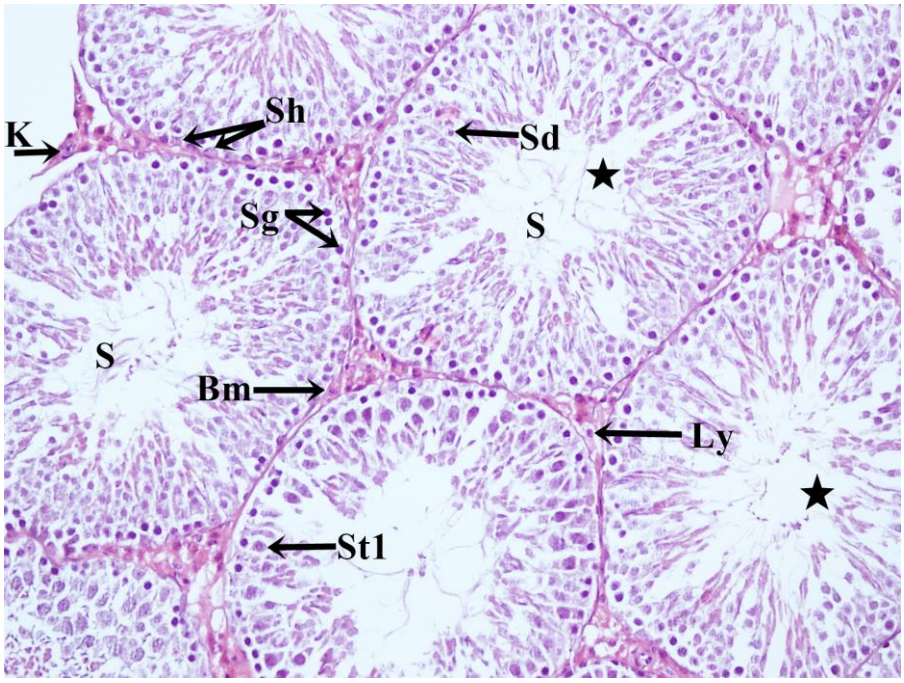
Kontrol Grubuna Ait Işık Mikroskobik Bulgular

Kontrol grubu deneklerinden alınan 5µm kalınlığındaki testis dokusu kesitleri, rutin H+E boyası ile boyanıp incelendiğinde; seminifer tübülleri döşeyen epitelde organizasyon bütünlüğü izlenmiştir (Şekil 4,5).

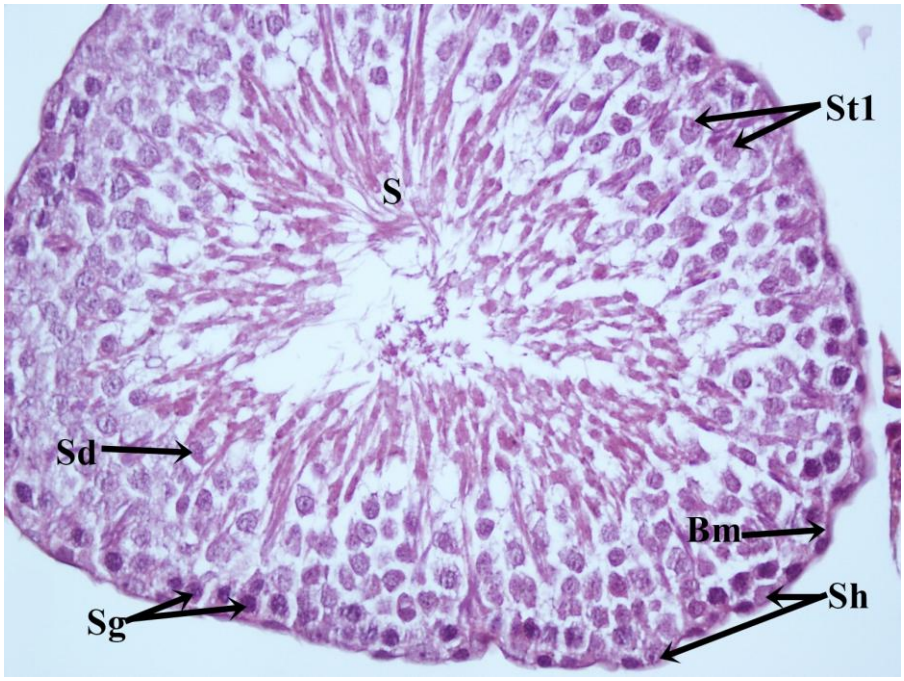
Seminifer tübüllerde bazal membranın hemen üzerine, spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri yerleşmiştir. Spermatogonyumların üzerinde konumlanmış olan spermatosit-I'ler ise belirgin nükleusları, geniş sitoplazmaları ve en büyük çapa sahip olmalarıyla, spermatogenik seri hücreleri arasından kolaylıkla ayırt edilmektedir. Spermatosit-II'ler ise çok sık görülememekle birlikte, spermatosit-I'lerin hemen üzerinde konumlanmaktadır. Spermatidler; lümene yakın yerleşmiş olup, koyu boyanmış nükleuslarıyla, geç spermatidler; lümene bakan kuyruklarıyla izlenirken, spermler; uzun, iğ şeklindeki nükleusları ile lümende izlenmektedir (Şekil 4,5).

Seminifer tübüller arasındaki interstisyel bağ dokuda yeralan Leydig hücreleri, H+E boyanmış kesitlerde genellikle poligonal şekilleri, eosinofilik boyanmış sitoplazmaları, yuvarlağa yakın nükleusları, kan damarları etraflarındaki yerleşimleri ile diğer hücrelerden rahatlıkla ayırt edilebilmektedir (Şekil 4).

Kontrol grubuna ait deneklerden alınan kesitlerin ışık mikroskobik bulguları incelendiğinde normal bir testis doku organizasyonu sergilediği görülmektedir (Şekil 4,5).



Şekil 4. Kontrol grubu deneklerinden alınan testis dokusu kesitlerinde; seminifer tübüller(*), bazal membran (Bm), Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I (St1), spermatid (Sd), Leydig hücresi (Ly), kan kapilleri (K) ve spermler (S) gözlenmektedir. H+E, X200.



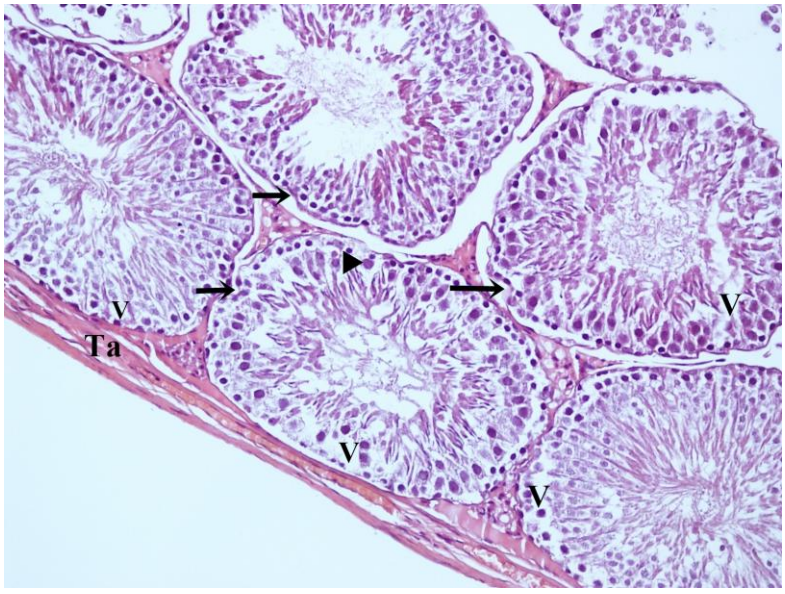
Şekil 5. Kontrol grubuna ait bu fotomikrograftaki seminifer tübülde; bazal membran (Bm), Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatid (Sd) ve spermler (S) gözlenmektedir. H+E, X400.

Diyabet Grubuna Ait Işık Mikroskobik Bulgular

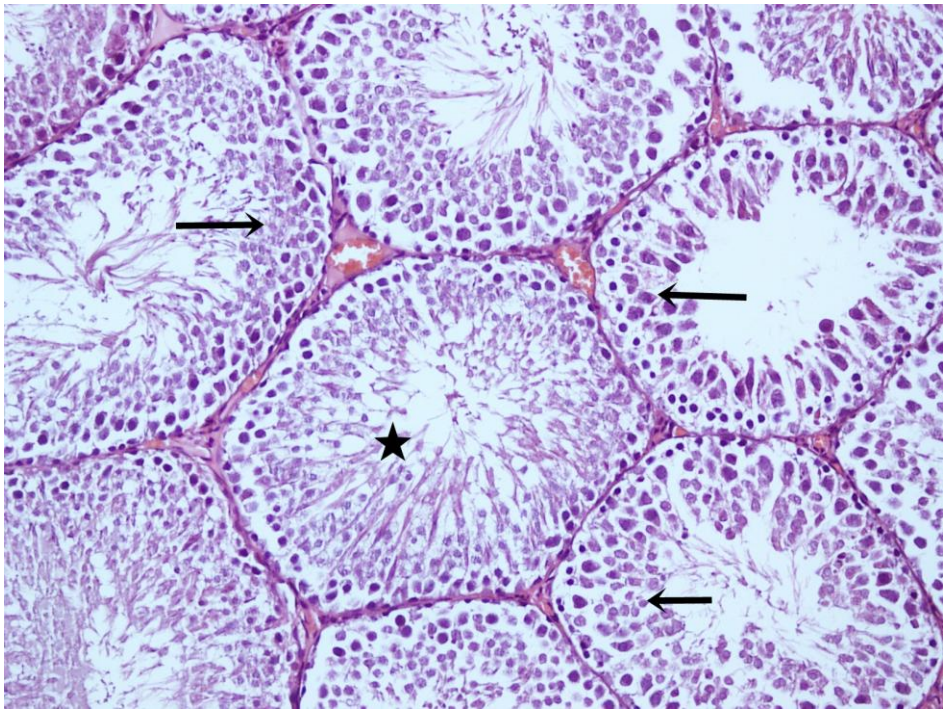
Diyabet grubu deneklerinden alınan 5µm kalınlığındaki, H+E boyası uygulanan, testis doku kesitlerinde; seminifer tübüllerin bazal membranlarında ondülasyonlar dikkati çekmektedir (Şekil 6-9). Çaplarının, kontrole göre anlamlı derecede azalmış ($P<0.001$; Tablo 3) olduğunu tespit ettiğimiz seminifer tübüllerin çoğunda, şekil bozuklukları izlenmiştir. Bazı seminifer tübül lümenlerinde, olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülen spermatogenik seri hücrelerinin varlığı ve spermatogenezin kesintiye uğraması dikkati çekmiştir (Şekil 7). Ayrıca, seminifer tübüllün bazal membranı ile germinal epitel arasında, kontrol grubunda gözlenmeyen ayrışmalar bulunmaktadır (Şekil 8).

Germinal epitelde bulunan bazı hücreler arasında, yer yer geniş vakuollerin oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 6,8). Seminifer tübüllerin; normal şekil, büyüklük ve yapısından farklı olması sebebiyle, etrafını çevreleyen interstisyel bağ dokuda da kalınlaşmaların meydana geldiği dikkat çekmiştir (Şekil 7,8).

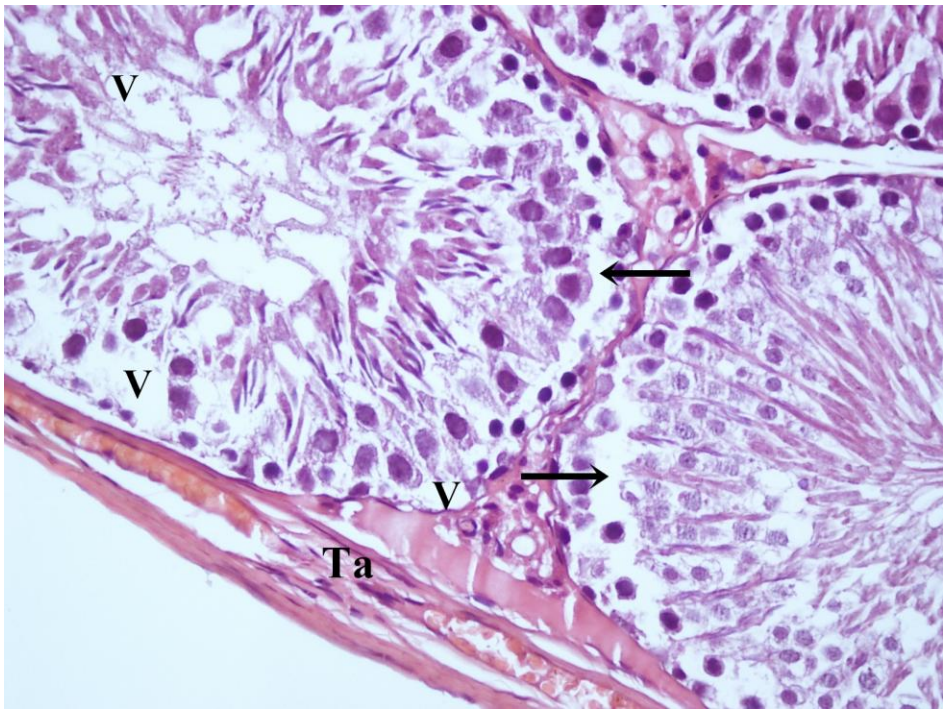
Seminifer tübüllerde; germinal hücrelerinin diziliminde bozulma, hücre kayıpları ve organizasyon bütünlüğünde bozukluklar gözlenmiştir (Şekil 6-9). Sertoli hücreleri ve spermatogonyum ve spermatosit-I'lerden oluşan seminifer tübüllerle birlikte; spermatogonyum, spermatosit-I, spermatid ve sperm bulunduran tübüller de bulunmaktadır (Şekil 6-8). Ayrıca bazı seminifer tübüllerde dev hücre gelişimi de izlenmiştir (Şekil 6,9).



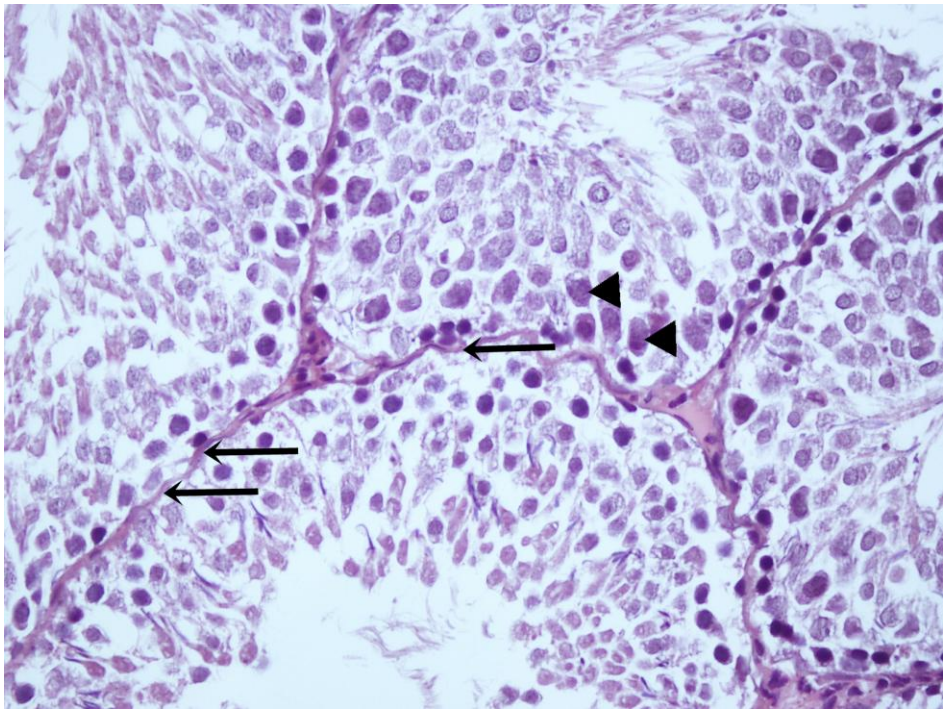
Şekil 6. Diyabet grubuna ait bu testis mikrografında; Tunica albuginea (Ta), çapı küçülen seminifer tübüllerde ise; bazal membranlarda ondülasyonlar (→), germinal seri hücrelerinde vakuolizasyonlar (V) ve dev hücre gelişimi (►) göze çarpmaktadır. H+E, X200.



Şekil 7. Diyabet grubu mikrografında; seminifer tübül (*) ve spermatogenik seri hücrelerinde düzensizlik (→) dikkati çekmektedir. H+E, x200.



Şekil 8. Diyabet grubuna ait fotomikrografta; Tunica albuginea (Ta), germinal seri hücrelerinde vakuolizasyonlar (V) ve bazal membran ile spermatogenik seri hücreleri arasındaki ayrışmalar (→) göze çarpmaktadır. H+E, X400.



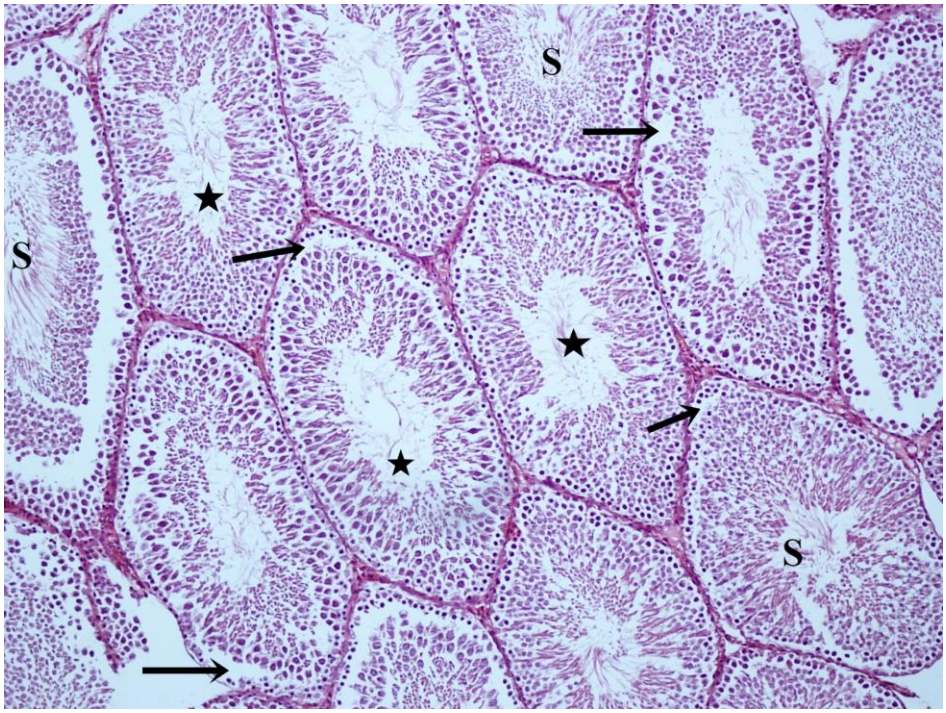
Şekil 9. Diyabet grubuna ait fotomikrografta; seminifer tübüllerde dev hücre gelişimi (►) ve bazal membranda ondülasyonlar (→) göze çarpmaktadır. H+E, X400.

Arı Sütü Grubuna Ait Işık Mikroskobik Bulgular

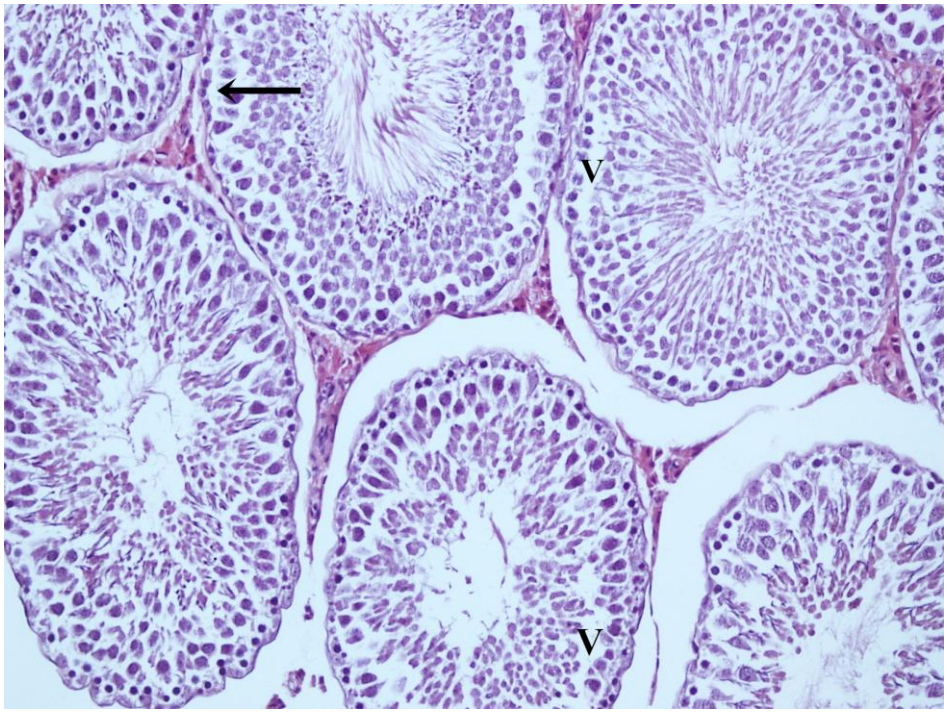
Diyabet oluşturulduktan hemen sonra, arı sütü uygulanmaya başlanan bu gruba ait testis doku kesitleri incelendiğinde; kontrol grubuna göre, tübül çaplarının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($P<0.001$; Tablo 3) gözlenmesine rağmen, diyabet grubunun tübül çaplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($P<0.001$; Tablo 3) olduğu dikkat çekmektedir.

Seminifer tübülün bazal membranından, tübül lümenine doğru sırası ile spermatogonyumlar, spermatosit I'ler, spermatosit II'ler, erken ve geç spermatidler ile tübül lümeninde spermlerin yer aldığı normal histolojik yapıda izlenen tübüllerde, diyabet grubuna göre bazal membran ondülasyonlarının azalmış olduğu, gözlenmektedir (Şekil 10-13).

Bazı seminifer tübüllerde; az sayıda spermatid ve spermlerin gözlendiği ya da spermlerin hiç bulunmadığı da izlenmiştir. Germinal seri hücrelerinde ise sitoplazmik kayıplar, vakuolizasyonlar gözlemlenmiştir (Şekil 11-13). Ayrıca, seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmaların bulunması dikkati çekmektedir (Şekil 10,11).



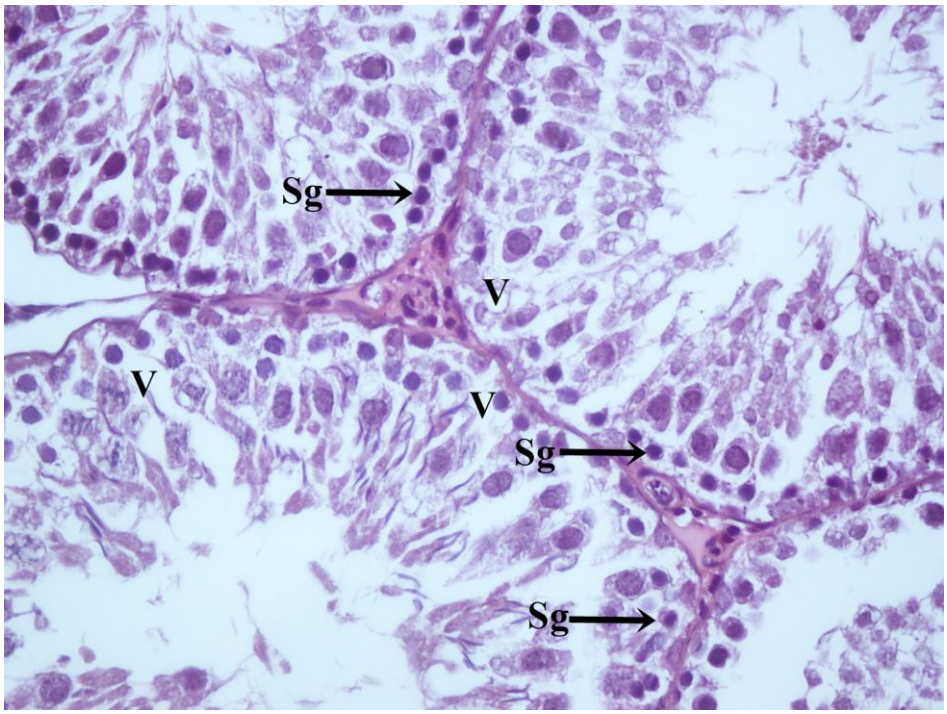
Şekil 10. Arı sütü grubuna ait bu mikrografta; seminifer tübüllerde (*), spermlerin gözlendiği (S), ancak bazı tübüllerde yer yer bazal membran ile spermatogenik seri hücreleri arasındaki ayrışmalar (→) bulunduğu izlenmektedir. H+E, x100.



Şekil 11. Arı sütü grubuna ait bu mikrografta; bazal membran ile spermatogenik seri hücreler arasında ayrışma (→), germinal seri hücrelerinin arasında vakuolizasyon (V) olduğu görülmektedir. H+E, x200.



Şekil 12. Arı sütü grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübül epitelinin normal organizasyonda izlendiği, Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlardan (Sg) itibaren tüm seri hücrelerin bulunduğu ve spermlerin (S) lümende yer aldığı gözlenmektedir. Ancak bazal membranda (Bm) ondülasyonlar ve yer yer izlenen vakuolizasyonlar (V) bulunmaktadır. H+E, x400.



Şekil 13. Seminifer tübüllerde; germinal seri hücrelerinde vakuolizasyonlar (V), bazı dejeneratif bozukluklar ve spermatogonyumlar (Sg) gözlenmektedir. H+E, x400.

TUNEL Bulguları

Kontrol, diyabet ve arı sütü gruplarında TUNEL metoduyla, apoptotik hücreler gösterilmeye çalışılmıştır. Apoptozisin değerlendirilmesinde, "apoptotik hücre indeksi" ve "apoptotik tübül indeksi" olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında; apoptotik tübül indeksinin diyabet grubunda, kontrole göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (P<0.001; Tablo 4). Ancak diyabet oluşturulduktan sonra arı sütü uygulanan grupta, apoptotik tübül indeksinin diyabet grubuna kıyasla anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir (P<0.001; Tablo 4).

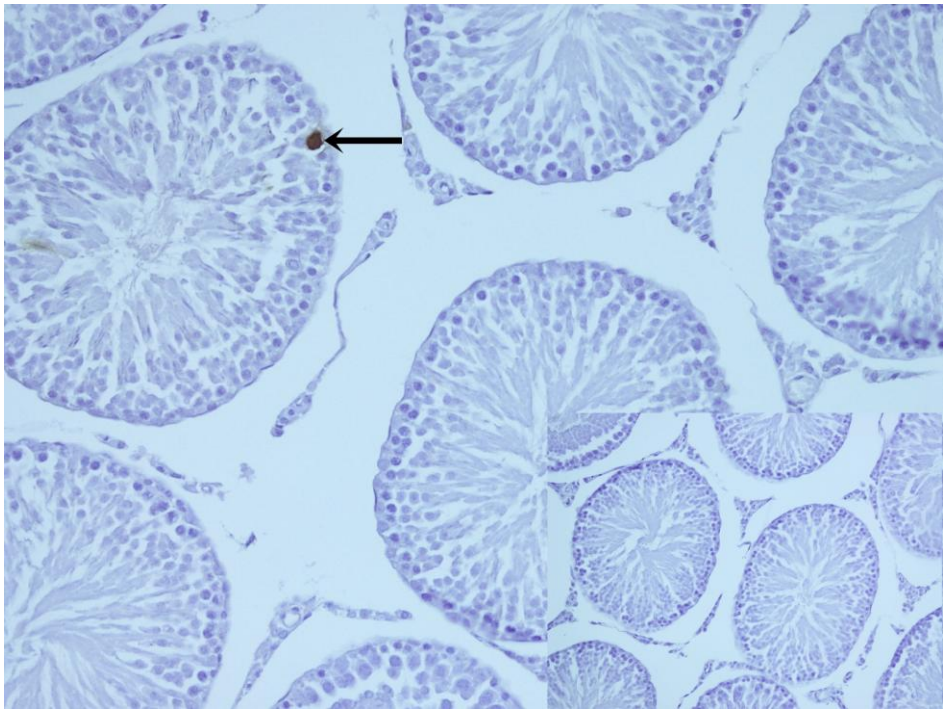
Tablo 4'te değerleri belirtilen apoptotik hücre indekslerinin ise; diyabet grubu deneklerinde, kontrol grubu deneklerine göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir (P<0.001; Tablo 4). Arı sütü uygulanan deneklerin diyabet grubundaki deneklere göre apoptotik hücre indeksleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü (P<0.001; Tablo 4) saptanmıştır.

Tablo 4. Apoptotik tübül ve apoptotik hücre indeksleri

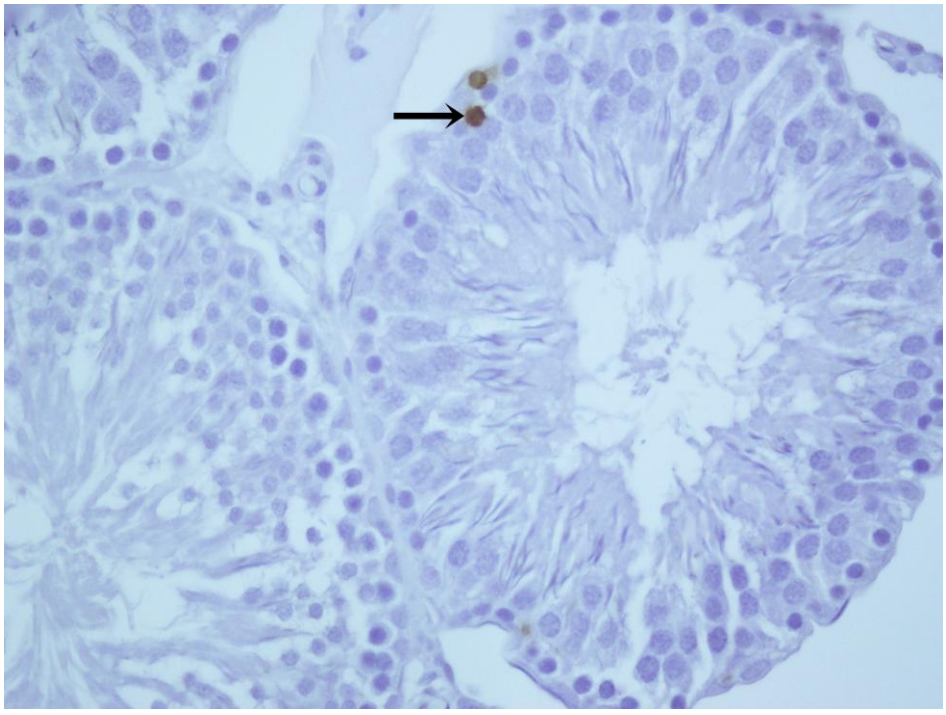
	Kontrol Grubu (n=6)	**Diyabet Grubu (n=8)**	**Arı Sütü Grubu (n=6)**	**Gruplar Arası P**
Apoptotik tübül indeksi	4.50 ± 1.871 (2-7)	28.88 ± 4.357 (23-36)	7.33 ± 2.066 (5-10)	
P		**<0.001***	0.093* **<0.001†**	**<0.001**
Apoptotik hücre indeksi	2.67 ± 0.816 (2-4)	16.38 ± 4.373 (12-25)	3.50 ± 1.049 (2-5)	
P		**<0.001***	0.402* **<0.001†**	**<0.001**

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

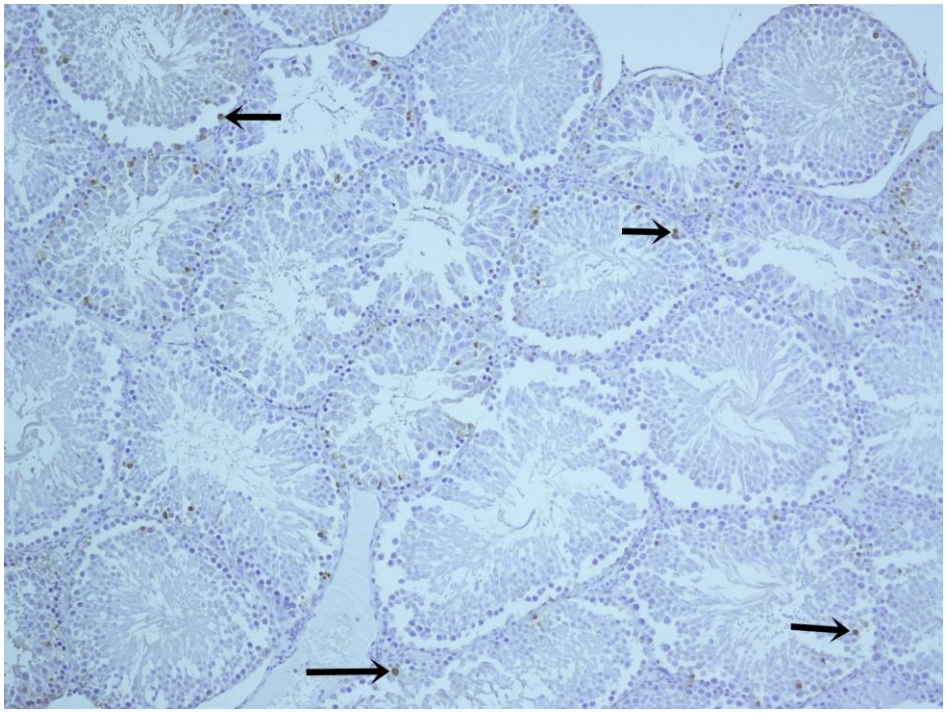
Apoptotik hücrelerin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan TUNEL yöntemi; kontrol grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, seminifer tübüllerde az sayıda hücrede pozitivite göstermiş ve bunların özellikle spermatogonyum hücreleri olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14,15). Diyabet grubuna ait testis kesitlerindeki seminifer tübüllerde, spermatogenik seriye ait çok sayıda hücrede TUNEL pozitivitesi izlenmiştir (Şekil 16-18). Arı sütü grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark izlenmezken, diyabet grubuna göre istatistiksel anlamlılığı olan, bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 19-21).



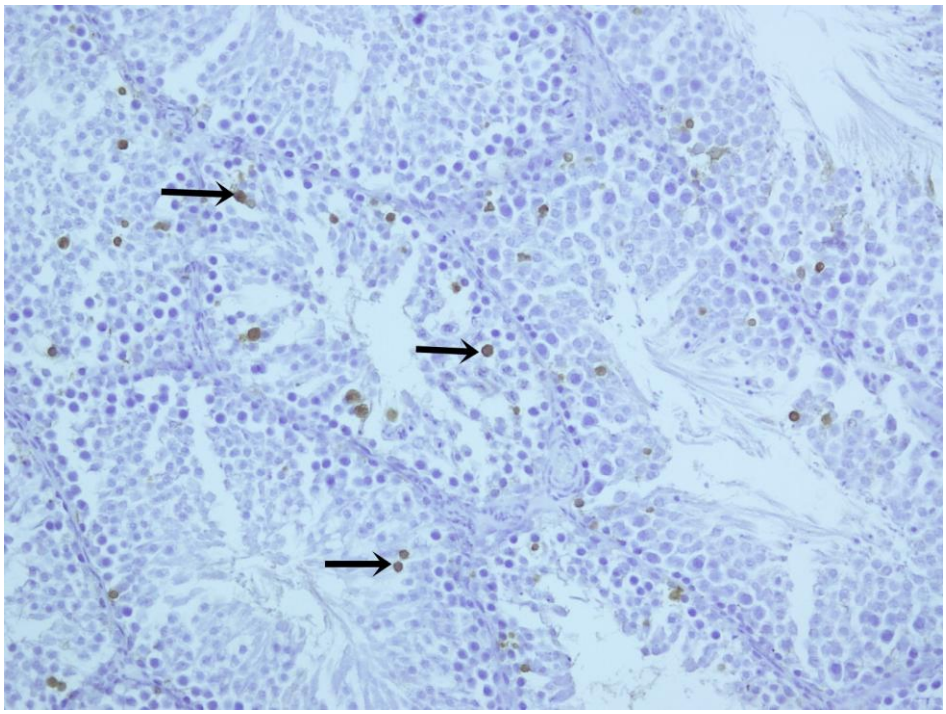
Şekil 14. Kontrol grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübüllerde, az sayıda TUNEL pozitif hücre (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilen zıt boyaması, X200.



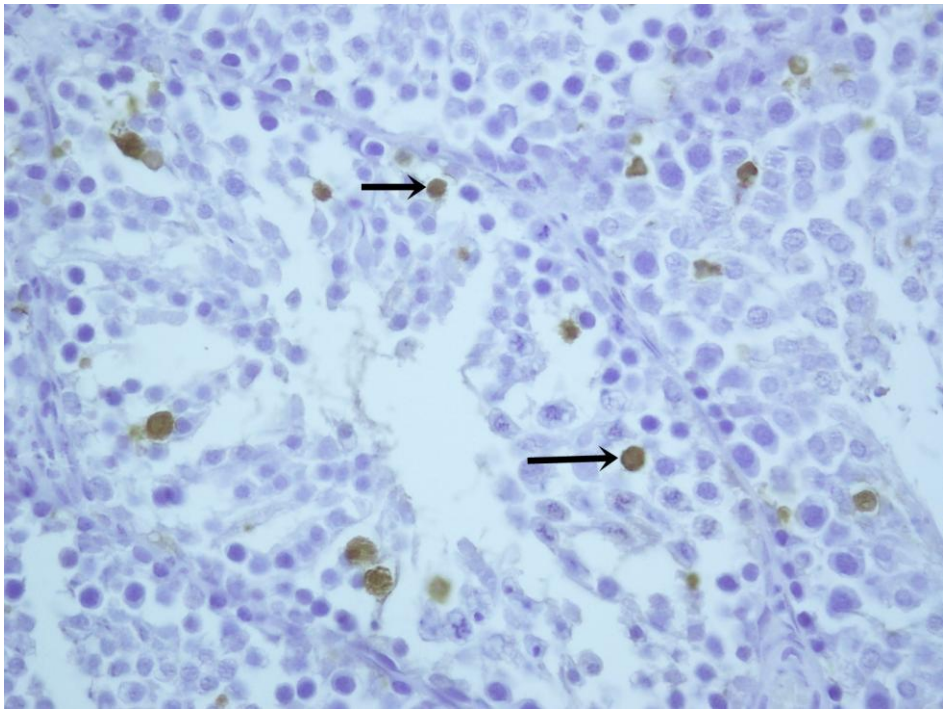
Şekil 15. Kontrol grubuna ait testis dokusunda; seminifer tübüldeki, TUNEL pozitif hücre (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



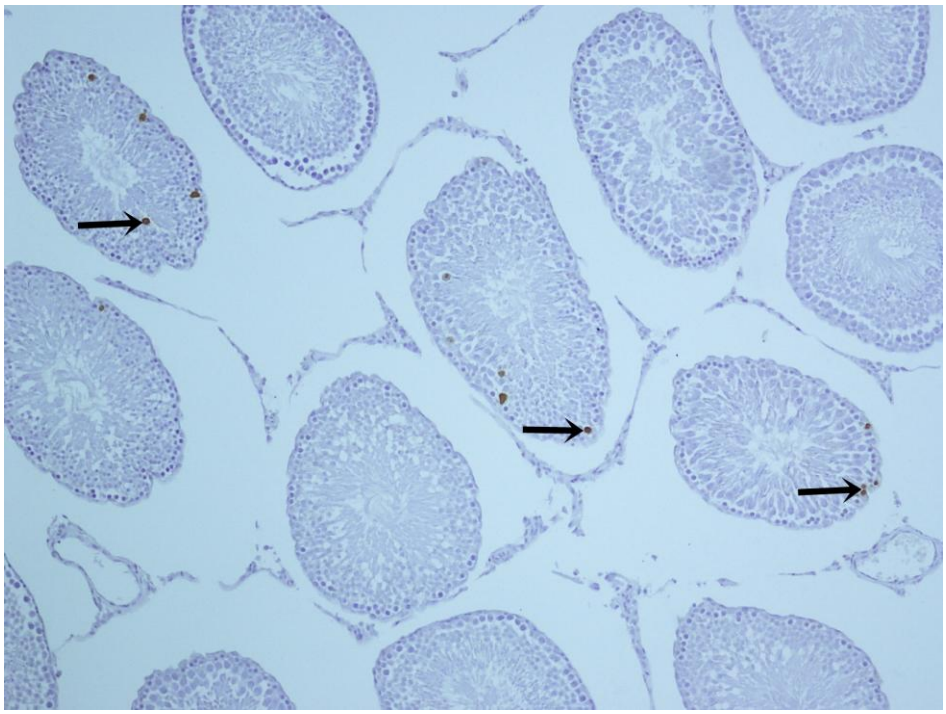
Şekil 16. Diyabet grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübüllerdeki çok sayıda TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X100.



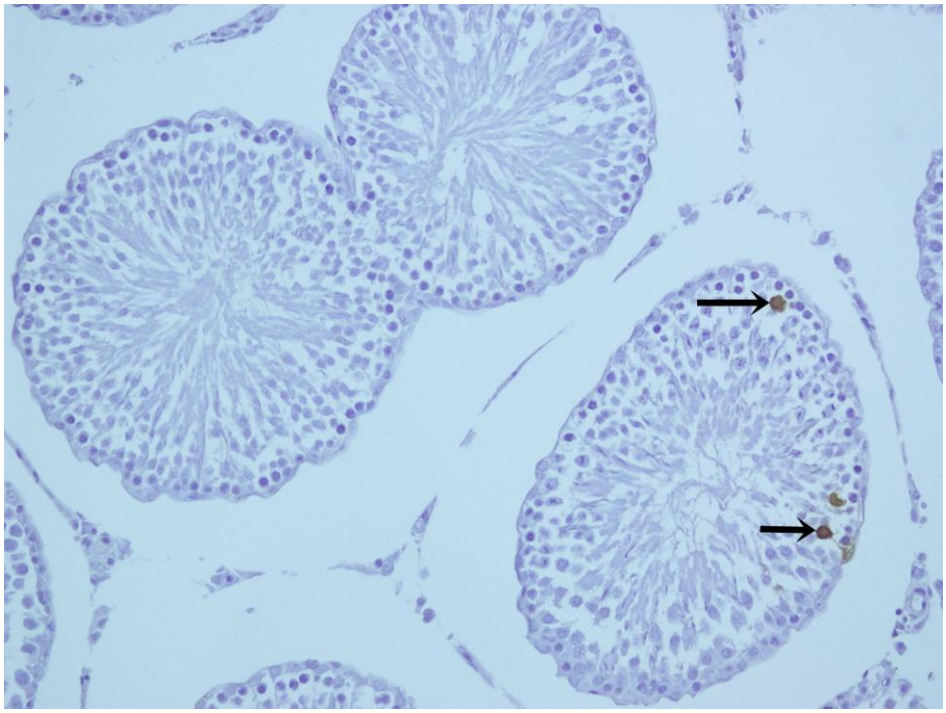
Şekil 17. Deneysel diyabet oluşturulan gruba ait bu kesitte; seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif hücreler (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



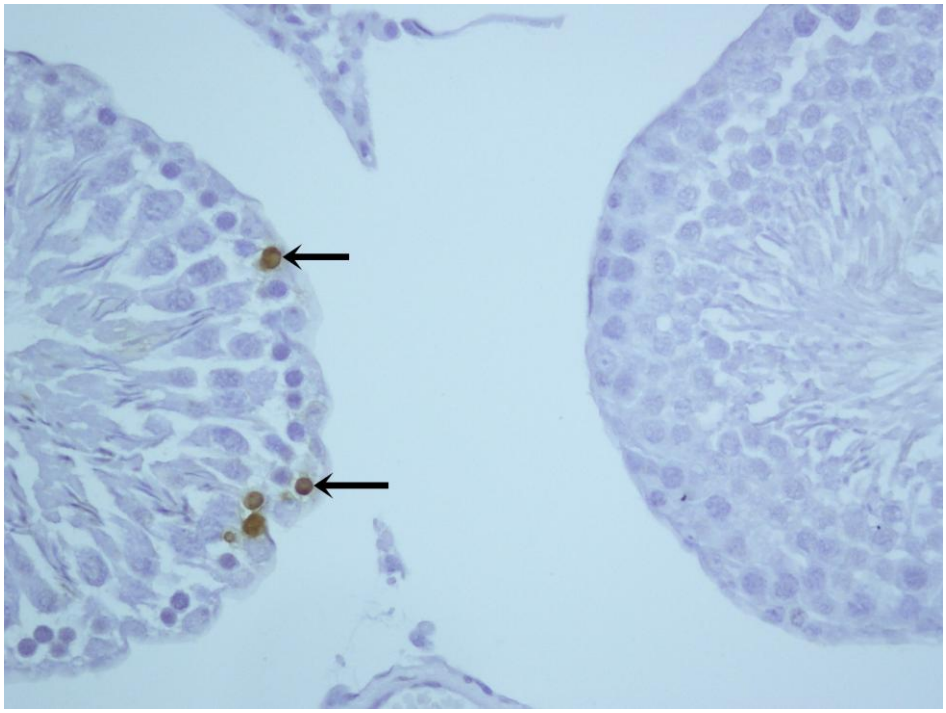
Şekil 18. Diyabet grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübüllerdeki spermatogenik seriye ait farklı hücrelerde immünpozitif reaksiyon (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 19. Arı sütü grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübüllerdeki TUNEL tekniği ile pozitif reaksiyon veren hücreler (→) izlenmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 20. Arı sütü gruba ait bu fotomikrografta; TUNEL pozitif reaksiyon veren hücreler (→) görülmektedir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



Şekil 21. TUNEL tekniği ile belirlenen apoptotik hücreler (→) ile belirtilmiştir. TUNEL ve hematoksilen zıt boyaması, X400.

İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm gruplara ait testis dokusu kesitlerine uygulanan PCNA immünreaktivitelerinin değerlendirilmesi; her preparatta 1000 hücredeki (ortalama 3 veya 4 seminifer tübül) immünpozitif hücreler sayılarak "proliferasyon indeksi" yapılmıştır. INSL3 immünreaktivitesi ise her preparattaki 10 farklı interstisyel alanda pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin sayılması ile hesaplanan, $1mm^2$ alandaki Leydig hücre sayısını göstermektedir (Tablo 5).

Tablo 5. PCNA (Proliferasyon indeksi) ve INSL3 immünreaktivite değerleri

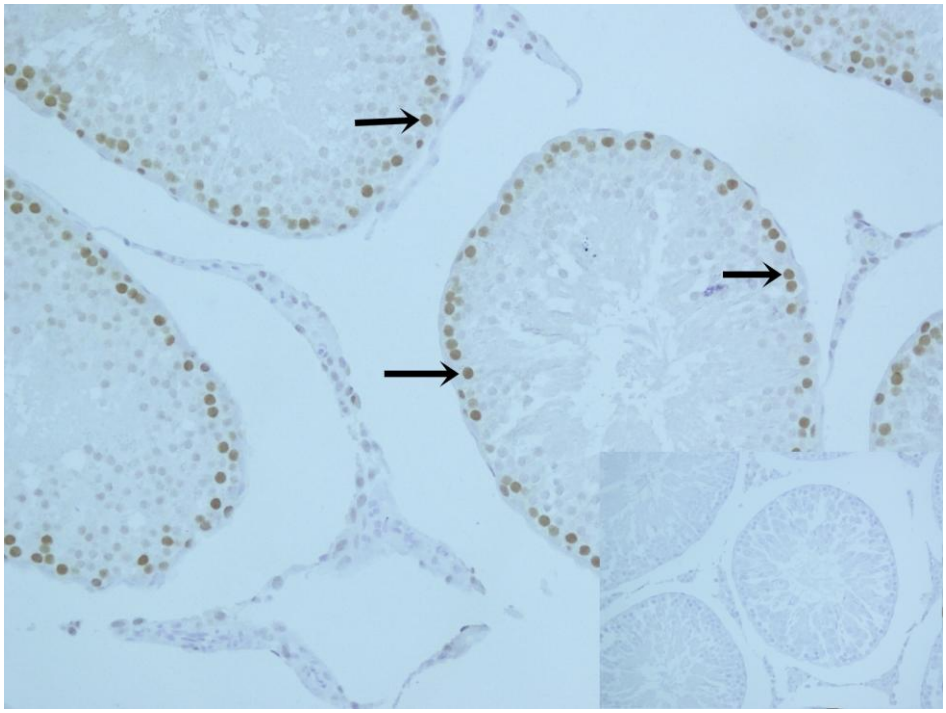
	Kontrol Grubu (n=6)	**Diyabet Grubu (n=8)**	**Arı Sütü Grubu (n=6)**	**Gruplar Arası P**
PCNA	205.00 ± 18.708 (180-230)	105.00 ± 12.247 (90-125)	160.83 ± 6.646 (150-170)	
P		**<0.001***	**0.004*** **<0.001†**	**<0.001**
INSL3	570.67 ± 16.943 (552-591)	311.63 ± 65.384 (265-419)	414.67 ± 15.578 (392-430)	
P		**<0.001***	**<0.001*** **0.008†**	**<0.001**

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

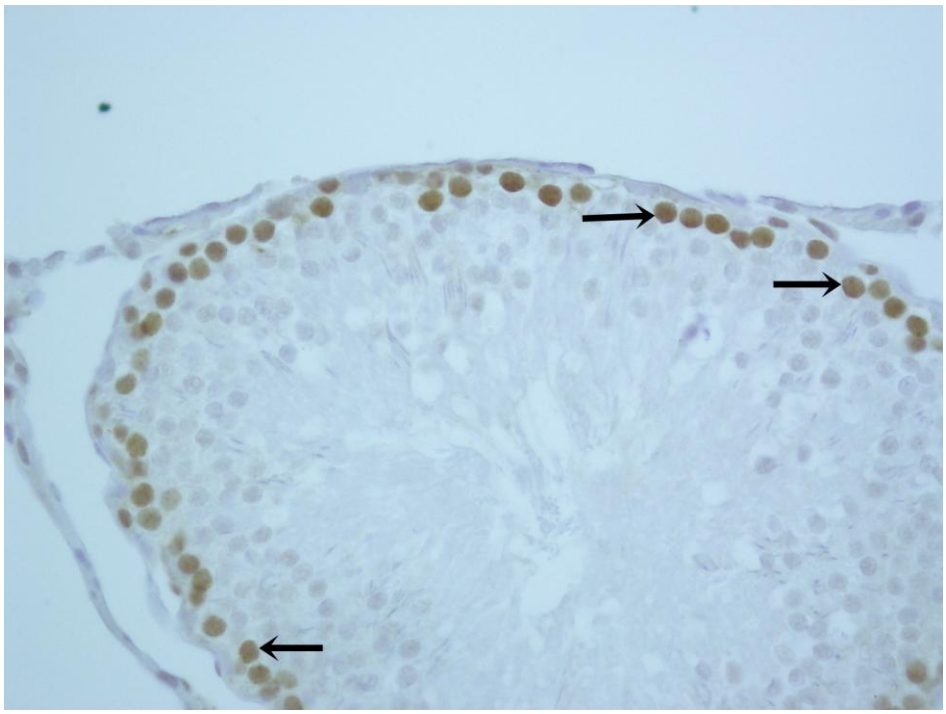
PCNA immünreaktivite bulguları: Kontrol grubuna ait testis dokularından alınan kesitler incelendiğinde; seminifer tübüllerde yer alan spermatogonyumlarda, hücresel lokalizasyonu nükleer olan, çok sayıda immünpozitif hücre izlenmiştir (Şekil 22,23).

Diyabet grubuna ait testis dokularında izlenen PCNA immunpozitif hücre sayısı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (P<0.001; Tablo 5). Bu bulgu bize; spermatogonyumların bölünerek, yeni spermatogenik seri hücrelerinin üretimine olanak veren spermatogonyum sayısının azaldığını göstermektedir (Şekil 24,25).

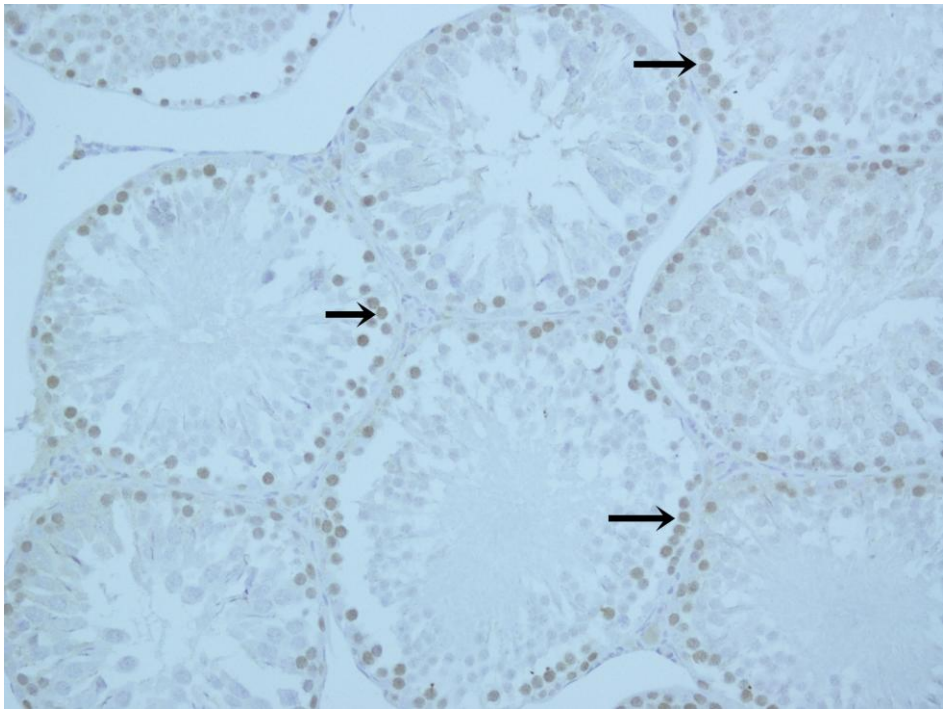
Arı sütü grubundaki deneklerden alınan testis dokusu kesitleri incelendiğinde; seminifer tübüllerde PCNA (+) reaksiyon veren spermatogonyumların, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az olduğu (P=0.004; Tablo 5), ancak diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir (P<0.001; Tablo 5; Şekil 26,27).



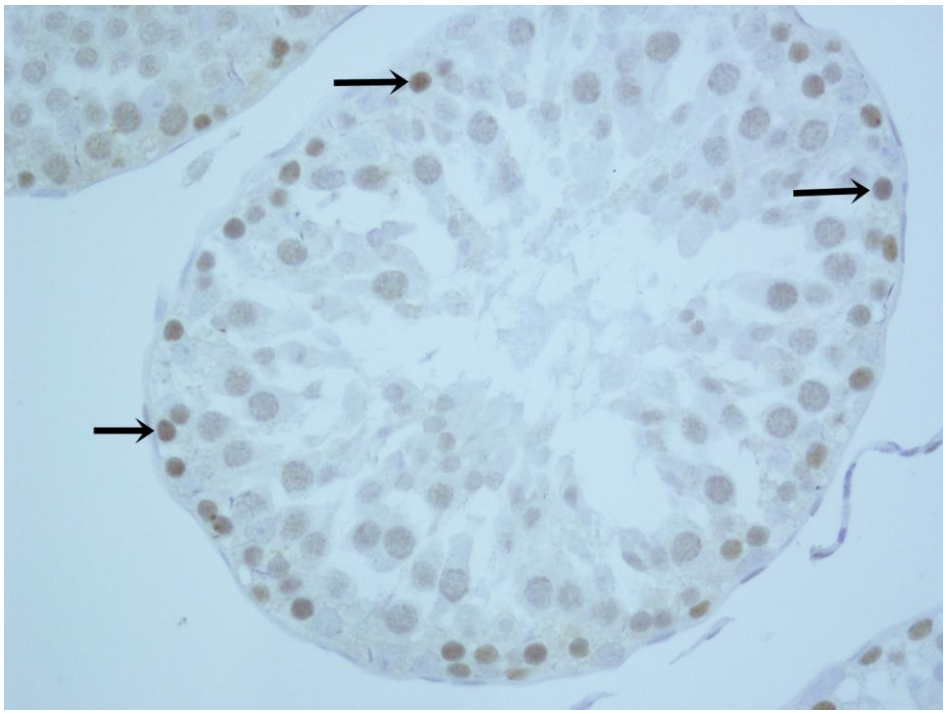
Şekil 22. Kontrol grubuna ait bu mikrografta; seminifer tübüllerde çok sayıda spermatogonyumun (→) PCNA ile pozitif reaksiyon verdiği görülmektedir. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilen zıt boyaması, X200.



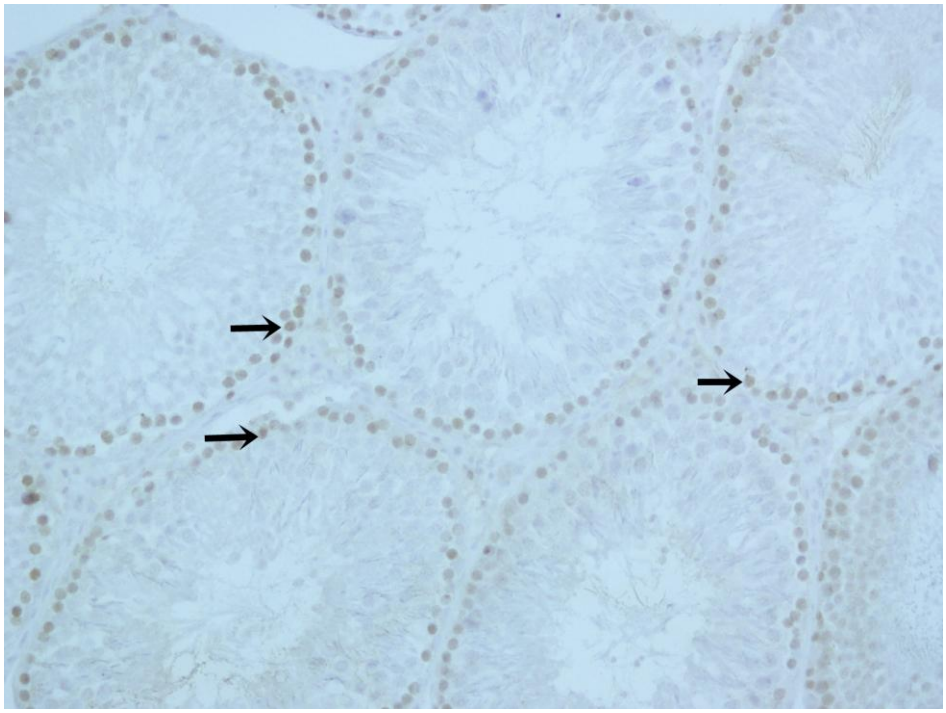
Şekil 23. Kontrol grubu kesitinde; PCNA (+) hücreler (→) gözlenmektedir. PCNA ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



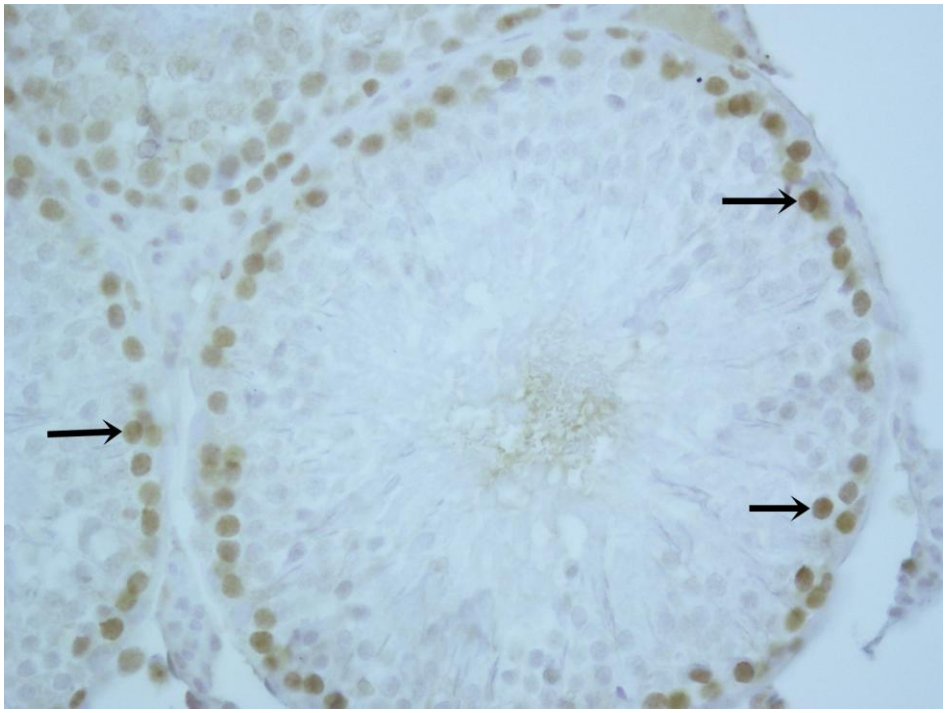
Şekil 24. Diyabet grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübüldeki az sayıda PCNA pozitif reaksiyon veren hücreler (→) izlenmektedir. PCNA ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



Şekil 25. PCNA ile pozitif reaksiyon veren hücreler (→) görülmektedir. PCNA ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 26. Arı sütü grubunda; seminifer tübüllerde PCNA ile pozitif reaksiyon veren hücreler (→) gözlenmektedir. PCNA ve hematoksilen zıt boyaması, X200.

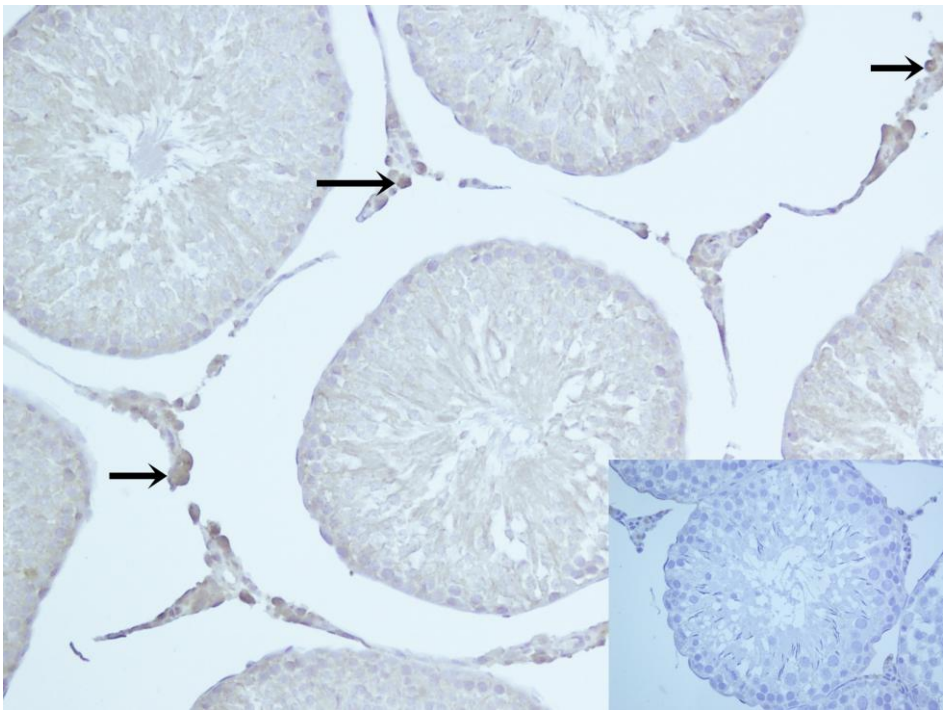


Şekil 27. Arı sütü grubuna ait bu fotomikrografta; diyabet grubuna göre seminifer tübüllerdeki immünpozitif hücrelerin (→) sayıca fazlalığı dikkat çekmektedir. PCNA ve hematoksilen zıt boyaması, X400.

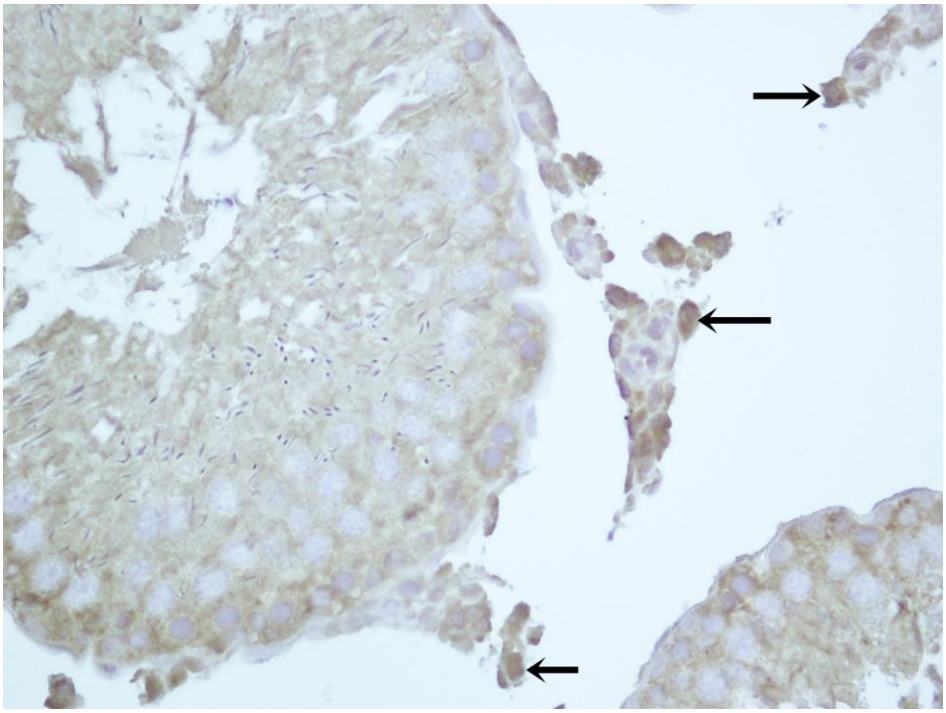
INSL3 immünreaktivite bulguları: INSL3, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında lokalize olan bir proteindir. Kontrol grubuna ait deneklerin testis dokularındaki çok sayıda immünpozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin bulunması önemlidir (Şekil 28-30).

Diyabetik grubun testis preparatlarındaki seminifer tübüllerin arasında bulunan interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde immünlokalizasyonu sitoplazmik olan, az sayıda immünpozitif hücre izlenmiştir. Diyabet grubu testis preparatlarında bulunan immünpozitif Leydig hücre sayısında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.001$; Tablo 5, Şekil 31-33).

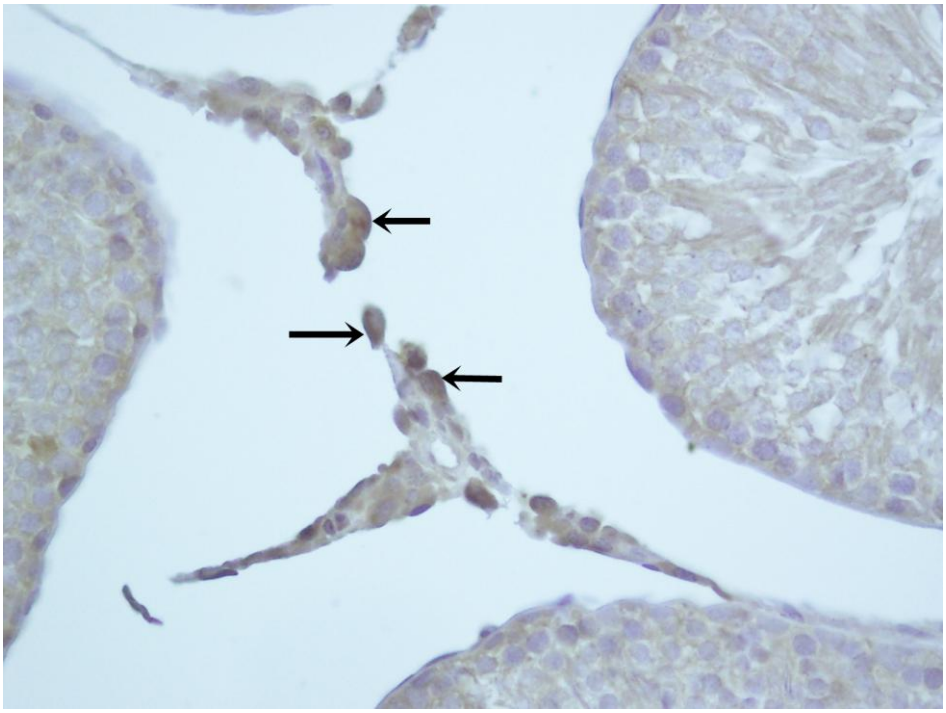
Arı sütü grubundan alınan testis dokusu kesitleri incelendiğinde ise; Leydig hücrelerinin sayısı, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmasına rağmen ($P<0.001$; Tablo 5), diyabet grubuna göre ise izlenen artış ($P=0.008$; Tablo 5) istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 34-36).



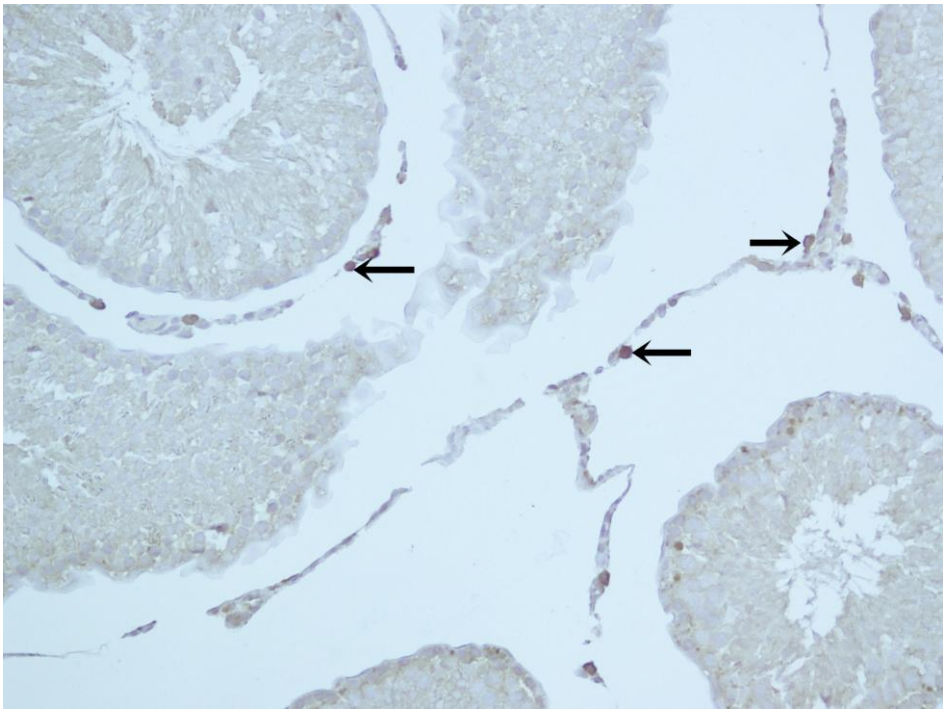
Şekil 28. Kontrol grubuna ait bu fotomikrografta; seminifer tübüllerin etrafındaki interstisyel alanda çok sayıda Leydig hücresinin (→) INSL3 ile pozitif reaksiyon verdiği görülmektedir. İçsel şekil; negatif kontrol, INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



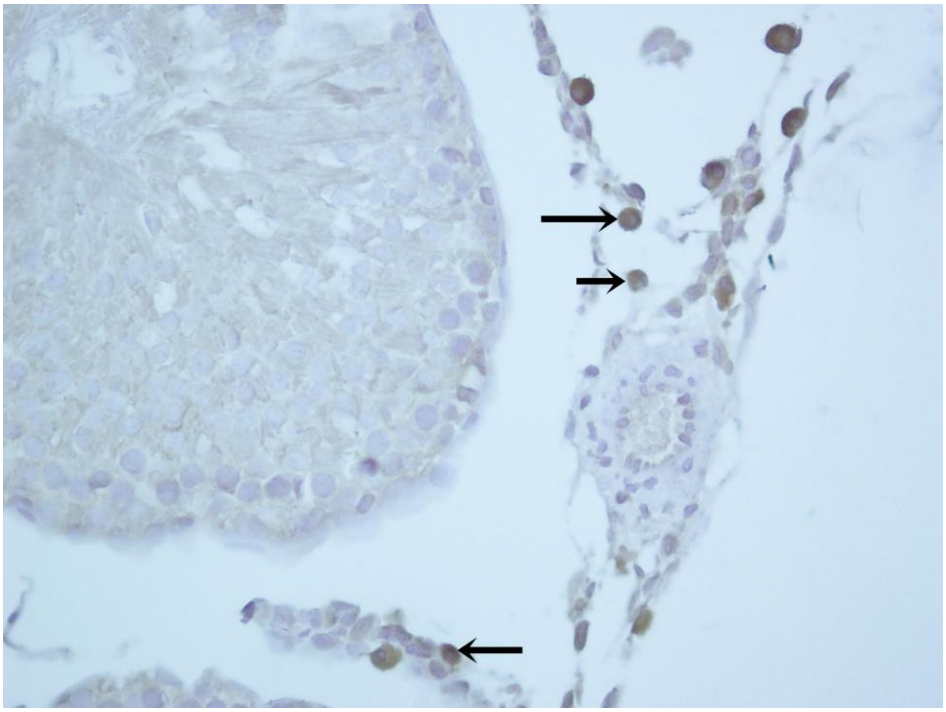
Şekil 29. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinin (→), INSL3 ile pozitif reaksiyon verdiği izlenmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



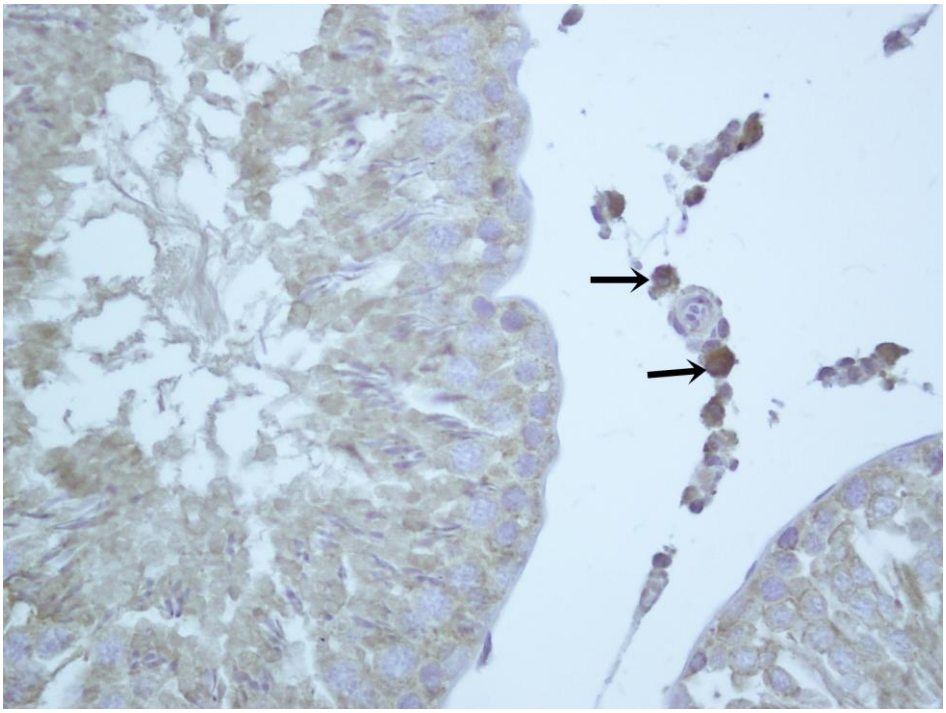
Şekil 30. INSL3 pozitif reaksiyon veren Leydig hücreleri (→) izlenmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



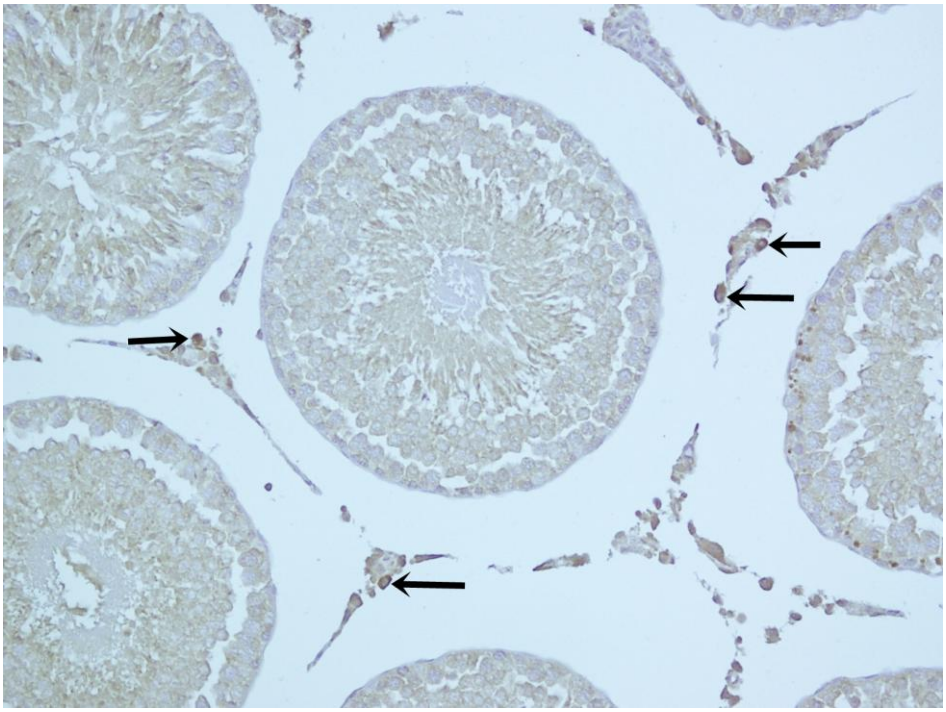
Şekil 31. Diyabet grubuna ait bu fotomikrografta; interstisyel alanda az sayıda bulunan Leydig hücrelerinin (→) INSL3 ile pozitif reaksiyon verdiği gözlenmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



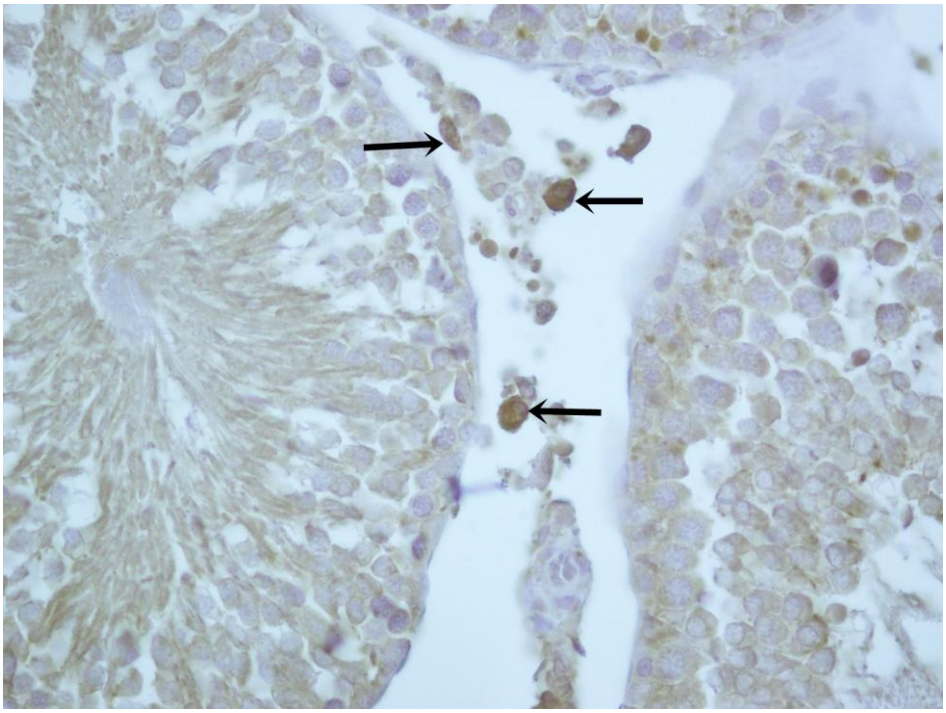
Şekil 32. Diyabet grubu testis dokusu kesitlerinde, İnterstisyel alandaki, Leydig hücrelerinin (→) INSL3 immünreaktivitesi görülmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



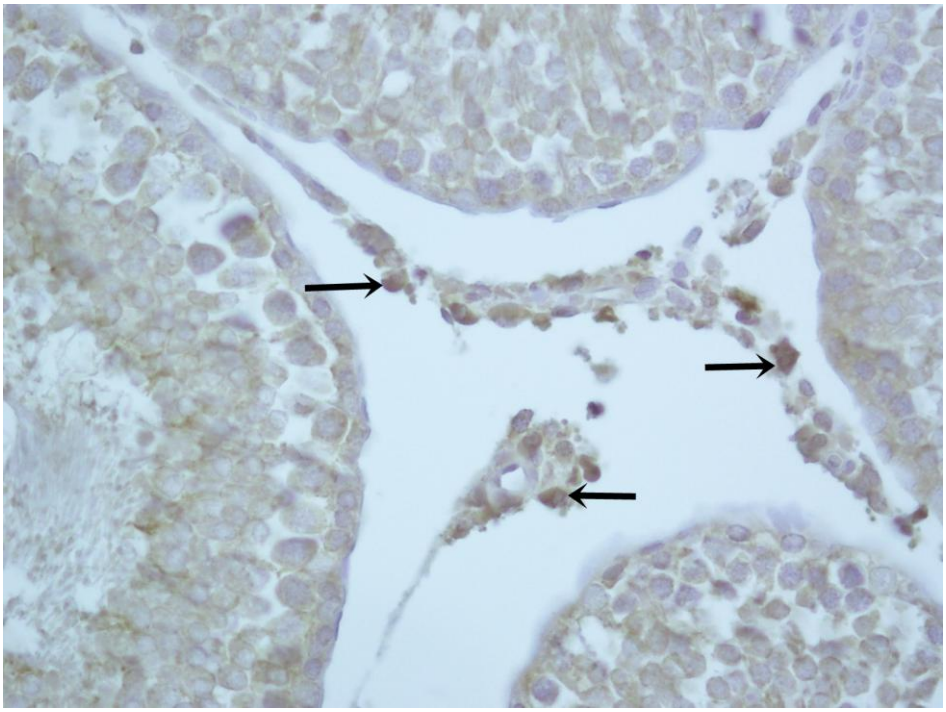
Şekil 33. Diyabet grubuna ait bu fotomikrografta; interstisyel alanda INSL3 ile pozitif reaksiyon veren Leydig hücreleri (→) izlenmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 34. Arı sütü grubundaki testis doku kesitlerinde, birçok Leydig hücresinin (→) INSL3 ile pozitif reaksiyon verdiği gözlenmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X200.



Şekil 35. Arı sütü grubuna ait bu fotomikrografta; İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinin (→) INSL3 immünreaktiviteleri izlenmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 36. İnterstisyel alandaki INSL3 (+) reaksiyon veren Leydig hücreleri (→) görülmektedir. INSL3 ve hematoksilen zıt boyaması, X400.

TARTIŞMA

Günümüzün en büyük sağlık sorunlarından biri olan diyabetin, subfertilite ve/veya infertiliteye sebep olduğu bilinmektedir. Diyabetik erkek infertilitesi, son zamanlarda diyabet komplikasyonları arasında dikkat çeken ve moleküler mekanizmaları yönünden, açıklanamayan pek çok araştırma sorusu içeren bir konudur. Diyabetin, erkek genital sistemde meydana getirdiği histopatolojik, biyokimyasal ve endokrinolojik değişimler, birçok deneysel çalışma ile ortaya konmuştur (2-6,8).

Diyabetik erkek bireylerde; retrograd ejakülasyon, libido azalması, hipogonadizm, erektil disfonksiyon, testiküler hacimde azalma, ürogenital sistemde mikrobiyal aktivitede artış, testosteron seviyelerinde düşüş, sperm sayı ve hareketliliklerinde azalma, semen hacminde azalma olduğu tespit edilmiştir. Histopatolojik değişiklikler arasında ise testiküler apoptozis, anormal spermatogenez ve seminifer tübül çaplarının azalması en belirgin bulgulardır (2,3,59-61).

Bu çalışmada, STZ uygulanmasıyla, deneysel diyabet modeli oluşturulmuş ve kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl'in üstünde olan denekler, diyabetik olarak (8,10,62-64) kabul edilmiştir. Arı sütü grubundaki deneklerin diyabet grubuna göre kan glukoz düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı artış olmasının (P=0.002), literatür bilgisiyle aynı olmadığı gözlenmiştir. Karaca ve ark. (8); deneysel diyabet modeli oluşturduktan sonra 4 hafta boyunca 400 mg/kg/gün arı sütü uyguladıkları deneklerin, diyabet grubuna göre kan glukoz düzeylerinin azaldığını belirtmişlerdir. Ghanbari ve ark. (14); 6 hafta süreyle 100 mg/kg/gün

dozunda arı sütü verdikleri grup ile diyabet grubu arasında, kan glukoz değerlerinin azaldığı tespit etmişlerdir.

Deney süresinin (4 hafta) sonunda, kardiyak ponksiyon ile alınan kan serumlarında, tüm grupların testosteron seviyelerine bakıldığında; diyabetik deneklerin testosteron düzeylerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı (P=0.002) ve bu sonucun, birçok araştırma (2,5,7,8,64-69) ile paralel olduğu belirlenmiştir. Karaca ve ark. (8)'nın 2015 yılında yaptığı çalışmada; diyabet grubunda izlenen testosteron düzeylerindeki azalmaya rağmen, diyabet oluşturulduktan sonra 4 hafta süresince günlük 400 mg/kg arı sütü verilen grupta, diyabet grubuna göre testosteron düzeylerinin istatistiksel anlamlılıkla arttığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda; diyabet ve arı sütü uygulanan diyabetik grup arasında, testosteron seviyelerinde izelenen artışın (P=0.686) anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Kontrol ve diyabet grubu arasındaki sonuçların uyumluluğuna rağmen, Karaca ve arkadaşlarının çalışmasıyla aynı doz ve sürelerde uyguladığımız arı sütüne, testosteron düzeyleri açısından elde ettiğimiz sonuçların; deneklerin cevaplarının farklı olmasıyla açıklanabileceği kanısındayız.

Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarla yapılan pek çok çalışmada, diyabetik deneklerde vücut (2,3,8,10,63,70-73) ve testis ağırlıklarının (2,8,10,63,65,72,74-76) kontrol grubuna kıyasla azaldığı belirtilmiş olup, yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz verilerle paraleldir (8,63,72). Pankreastaki β hücrelerinden salınan insülin hormonunun yeterince salgılanamaması veya glukoz intoleransı sonucunda, glukozun hücre içine alınmasında oluşan aksaklıklar neticesinde, hücrelerin enerji kaynağı olarak kendi yağlarını ve proteinlerini kullanmaya başlamaları sonucunda; diyabet ile birlikte, vücut ağırlığında azalma meydana gelmektedir.

Yaptığımız çalışmada; deneysel diyabet modeli oluşturulduktan sonra arı sütü verilen grup ile diyabet grubu vücut ağırlıklarını karşılaştırdığımızda, anlamlı bir fark bulunmazken (P=0.255); testis ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı bir artış (P=0.044) gösterdiği saptanmıştır. Ve bu bulgu, deneysel diyabet oluşturulup, farklı dozlarda arı sütü uygulanan çalışmalarla da benzerlik göstermektedir.

Khaneshi ve ark. (77)'larının yapmış oldukları çalışmada; diyabet patogeneziyle birlikte, testis dokusunun uzunluğunda ve hacminde azalma olduğunu, fakat susam yağı kullandıkları grupta, kontrol grubuna hemen hemen yakın değerler elde ettiklerini ifade etmişlerdir. Ersoy (11)'un 2016 yılında yaptığı çalışmada ise; diyabetik erkek sıçanlardan

oluşan grupta, kontrol grubuna göre testis uzunluklarında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildiği bildirilmiştir. Testis genişliği ile ilgili değerlerin ise; kontrol grubuna kıyasla diyabetik grupta, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiğini ifade etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada; diyabetle birlikte testis uzunluk ($P=0.003$) ve genişlik ($P<0.001$) değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Deneysel diyabet modeli oluşturulup arı sütü verilen grubun, diyabet grubuna göre testis uzunluğunda anlamlı bir artış bulunmuştur ($P=0.026$). Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bu verilerin, diyabet etkisiyle, testis ağırlığının azalması ile yakından ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Diyabetin sebep olduğu hiperglisemi, serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşumunu arttırmakta ve oluşan bu ROS'ların ortamdan yeterince hızlı kaldırılamaması sonucunda, oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres; hücrenin enerji ihtiyacını karşılayan, başta mitokondri olmak üzere, tüm hücre organellerinin ve hücrenin genetik materyalinin tahribatına neden olmakta, sonuç olarak da hücreyi apoptozise sürükleyen süreci başlatmaktadır. Bu durum, diyabet ile yapılan çalışmalarda, erkek ve dişi ürogenital sistemlerde disfonksiyona sebep olmaktadır.

Koroglu ve ark. (72), diyabetle ortaya çıkan oksidatif stresin, testiküler bozukluklara sebep olduğunu bildirmişlerdir. Diyabetle birlikte; LH, FSH ve testosteron seviyelerinde azalma olduğu (78) ve insülin metabolizma bozukluklarıyla da birlikte, seminifer tübüllerdeki spermatogonyumların sayısının ve insülin-aracılı hücre proliferasyonunun azalması nedeniyle, seminifer tübül çaplarında düşüş gözlendiği düşünülmektedir. Daha önceden yapılmış pek çok çalışma (3,12,64,65,70,79-82) gibi bizim çalışmamızda da, diyabet grubuna ait seminifer tübül çaplarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma ($P<0.001$) meydana gelmiştir. Ancak arı sütü grubunda, diyabet grubuna göre izlenen seminifer tübül çaplarındaki artışın ($P<0.001$) anlamlı olması bize, arı sütünün antioksidan etkisinin ortaya çıktığını düşündürmektedir (14,83).

Oksidatif stresin artmasıyla, diyabetik grupların testis dokusu kesitlerinde histopatolojik olarak; bazı seminifer tübüllerde çok nükleuslu dev hücreler, spermatogenik seri hücrelerinde organizasyon bozukluğu, gelişimini tamamlayamadan tübül lümenine dökülen hücreler, hücresel vakuolizasyonlar, bazı tübüllerde atrofi, anormal spermatogenez, interstisyel bağ dokuda kalınlaşma ve tübül bazal membranlarında kalınlaşmalar izlenmiştir. Benzer bulgular pek çok çalışmada gösterilmiştir (3,6,10,64,70,72,82,84). Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra, dört hafta süresince hergün 400 mg/kg arı sütü uygulamasının; diyabetik deneklerin

testis histopatolojilerinde gözlemlenen pozitif değişim, seminifer tübül çaplarında (P<0.001) ve proliferasyon indekslerinde izlenen artışın (P<0.001) yanında, apoptotik tübül (P<0.001) ve apoptotik hücre (P<0.001) indekslerinin azalmasıyla da, istatistiksel olarak doğrulanmıştır.

Diyabetik testis dokusunu inceleyen çalışmalarda, testiküler fonksiyon bozukluğunun, apoptozisi ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (2-6,10,11,14,37,38,59,60,62-72,74-76,79-82,84,85). Hipergliseminin neden olduğu ROS artışı, oksidatif stresin gelişmesine neden olup, hücre organelleriyle birlikte DNA'ya da zarar vermektedir. Mitokondriden sitokrom C salınmasına, kaspazların aktivasyonuna ve tüm bunların sonucunda apoptozun indüksiyonuna neden olmaktadır (74,86). Hücresel apoptoziste, DNA kırıkları meydana gelmektedir. Kırılmış olan DNA parçalarının, 3'-OH uçlarını belirlemek için immünohistokimyasal bir yöntem olan TUNEL metodu genellikle kullanılmaktadır (6,74,76,80,81,85,86). Sunduğumuz çalışmada, kontrol grubuna ait deneklerden alınan testis doku kesitlerini incelediğimizde; az sayıda TUNEL pozitif hücrelerin bulunduğu görülmüştür. Diyabet grubuna ait kesitler incelendiğinde ise; kontrol grubundaki deneklere göre apoptotik tübül (P<0.001) ve apoptotik hücre (P<0.001) indekslerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği ve bu sonuçların, birçok çalışma ile paralel olduğu (8,66,68,76,85,87-89) saptanmıştır. Arı sütü grubunda ise diyabetik gruba göre apoptotik tübül (P<0.001) ve apoptotik hücre (P<0.001) indekslerinde izlediğimiz azalmanın, oldukça dikkat çekici olduğu göze çarpmaktadır. Bu parametrelerde elde ettiğimiz ortalama değerler, neredeyse kontrol grubuna eşdeğerdir (Tablo 4). Diyabetik deneklere arı sütü uygulanmasıyla, testis dokusunda ortaya çıkan apoptozisle ilgili yolaklardaki proteinlerin rolüne ilişkin, yapılan diğer çalışmalar ise Karaca ve Ghanbari'ye aittir. Karaca ve ark. (8); 4 hafta boyunca 400 mg/kg/gün arı sütü uyguladıkları deneklerde, kaspaz-3 immünreaktivitesinin diyabetik deneklere göre anlamlı olarak azaldığını ifade etmişlerdir. Ghanbari ve ark. (14) çalışmalarında; deneysel diyabet oluşturduktan sonra, deneklere 6 hafta süreyle 100 mg/kg/gün arı sütü uygulamışlar ve diyabetik deneklerle karşılaştırıldığında, sperm DNA ve kromatin hasarı dahil, pek çok reproduktif parametrenin iyileştiğini göstermişlerdir.

Bir dokudaki hücre proliferasyonunun değerlendirebilmesi (prolifearsyon indeksi) için, PCNA immünreaktivitesi sıklıkla kullanılmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada, Altay ve ark. (3) ile Dönmez ve ark. (10)'nın çalışmalarındaki gibi; diyabetik deneklerin, kontrol grubuna göre proliferasyon indekslerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı (P<0.001) belirlenmiştir (6,10,14,83). Ghanbari ve ark. (83), 6 hafta süreyle 100 mg/kg/gün

arı sütü uyguladıkları deneklerin testis dokularında, spermiyogenez indeksi (SPI), Sertoli hücre indeksi (SCI) ve mayotik indeks (MI) değerlendirmelerini yapmışlardır. Diyabetik deneklerde, kontrol grubuna kıyasla SPI, SCI ve MI 'lerde anlamlı bir azalma gözlenirken; arı sütü uygulanması ile bu parametrelerin, anlamlı olarak artış gösterdiğini bildirilmişlerdir. Testiste diyabet nedeniyle meydana gelen hasarların, muhtemelen arı sütünün antioksidan etkisiyle iyileştiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda, arı sütü uygulanan grupta tespit edilen proliferasyon artışının, bu gruptaki apoptoz indeksleri ve histopatolojik hasarlardaki iyileşmeler göz önüne alınarak, arı sütünün koruyucu etkileriyle açıklanabileceği kanısındayız.

Leydig hücre fonksiyonunun bir göstergesi olan testosteron düzeylerinin yanı sıra, son yıllarda INSL3; yeni bir biyobelirteç olarak dikkat çekmektedir (37-41). Deneysel diyabet modellerinde (2,5,7,8,64-69) ve insanlarda (2,5) serum testosteron seviyelerindeki azalma, yaptığımız bu çalışma ile bir kez daha onayladığımız bir bulgudur. INSL3 immunreaktivitelerini değerlendirdiğimizde ise kontrol grubuna göre, diyabetik testis dokusunda anlamlı olarak azaldığı ($P<0.001$) tespit edilmiştir. Diyabetik bireylerde Leydig hücre disfonksiyonu sebebiyle, serum INSL3 seviyelerinin azaldığını gösteren çalışmalara rağmen (90-92); Ermetici ve ark. (38), 2009 yılında tip 2 diyabetli hastalarda yapmış olduğu çalışmada, serum INSL3 düzeylerinin değişmemiş olduğunu ve testosteron seviyeleriyle, INSL3 değerleri arasında korelasyon olmadığını ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da diyabet grubu ve arı sütü grubu karşılaştırıldığında; testosteron seviyelerindeki artış anlamlı değilken ($P=0.686$) ve INSL3 değerlerinin istatistiksel anlamlılıkla arttığı ($P=0.008$) tespit edilmiştir.

Ivell ve ark. (39), 2011 yılında yayınladıkları derlemede; dolaşım kanında azalan testosteronun, hipotalamus-hipofiz-testis ekseninindeki geribildirim mekanizmalarını etkilediğini bildirmişlerdir. Bu etkileşimde, Leydig hücrelerinin ve dolayısıyla INSL3'ün de rol aldığını düşünmekteyiz.

Arı sütünün moleküler düzeyde etkili olabilen güçlü bir antioksidan olduğunu gösteren araştırmalar, çalışmamızın başladığı günden bugüne kadar güncelliğini korumaktadır. Özellikle diyabetik testis dokusundaki etkinliklerini, INSL3 ekseninde değerlendirdiğimiz bu çalışmayla literatüre önemli bir katkı sağladığımız kanısındayız.

İlk kez diyabetik testis dokularında arı sütü etkisiyle, INSL3 protein immunreaktivitelerindeki değişimlerin gösterildiği bu çalışmayla; gerek diyabetik erkek subfertilite/infertilitesi gerekse in vitro fertilizasyon uygulamaları sürecinde testosteron haricinde, INSL3'ün rutin kontrollere eklenmesi gereken bir parametre olduğunu ve aynı zamanda arı sütünün de, etkili bir antioksidan olarak erkek subfertilite ve /veya infertilitesinin tedavisinde rol oynayabileceği görüşündeyiz.

SONUÇLAR

Diyabetik erkek subfertilite ve infertilitesi; günümüzde üzerinde pek çok araştırma yapılan diyabet komplikasyonlarındandır. Diyabetik erkek subfertilite ve infertilitesinde etkili olabileceğini düşündüğümüz arı sütünün, diyabetik erkek sıçan testis dokularına etkilerinin belirlenebilmesi için ve testis dokusundaki olası etkisine göre, yeni tedavi protokollerinin belirlenmesine katkı sağlamayı amaçladık. Ayrıca INSL3 gibi son yıllarda dikkat çeken bir biyobelirtecin kullanımıyla, diyabetik deneklerde azalan testosteron düzeylerine ek olarak, bir başka bakış açısı getirebileceğimizi düşündük.

Bu çalışmamızda; aynı biyolojik ve fizyolojik koşullar altında tutulan *Wistar albino* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=6), tek doz 50mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=8) ve tek doz 50mg/kg streptozotosin + 400 ml/kg/gün arı sütü uygulanan arı sütü grubu (n=6) olmak üzere 3 grup oluşturulmuş ve denekler dört haftalık deney süresi sonunda sakrifiye edilmişlerdir.

Elde ettiğimiz sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

1- Deney süresi sonunda, kan glukoz değerleri karşılaştırıldığında; arı sütü grubunun kan glukoz düzeyleri, diyabet grubuna göre artış (P=0.002) göstermiştir.

2- Sakrifikasyondan önce kardiyak ponksiyon ile alınan kan serumlarındaki testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında; arı sütü grubu değerleri ile diyabet grubu değerleri arasında anlamlı olmayan bir artış (P=0.686) gözlemlenmiştir.

3- Deneklerin vücut ağırlıkları ölçüldüğünde; diyabet ve arı sütü grubu vücut ağırlık değerlerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla P<0.001 ve P=0.002); ancak arı sütü grubunun, diyabet grubuna göre vücut ağırlık ortalamalarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (P=0.255) tespit edilmiştir.

4- Testis doku ağırlık ölçümlerinin; diyabet grubunda, kontrol ve arı sütü grubu değerlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı (sırasıyla P=0.018, P=0.044), arı sütü denekleri ile kontrol grubu denekleri arasındaki azalmanın anlamlı olmadığı (P=0.904) ve değerlerin birbirlerine çok yakın olduğu gözlenmiştir.

5- Seminifer tübül çapları karşılaştırıldığında ise; diyabet ve arı sütü gruplarında bulunan deneklerin, kontrol grubuna ait deneklerin verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla P<0.001, P<0.001), ancak arı sütü grubu seminifer tübül çapı değerlerinin, diyabet grubuna göre anlamlı olarak arttığı (P<0.001) belirlenmiştir.

6- Apoptotik tübül indeksi diyabet grubu sonuçlarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı (P<0.001), arı sütü grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı (P<0.001) tespit edilmiştir.

7- Apoptotik hücre indeksi sonuçları, apoptotik tübül indeksi değerleriyle doğru orantı göstermektedir. Diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, arı sütü grubunun apoptotik hücre indeksi değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (P<0.001) tespit edilmiştir.

8- PCNA immunreaktivite sonuçları ise; diyabet ve arı sütü grup değerlerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği (sırasıyla P<0.001 ve P=0.004), ancak arı sütü grubunda PCNA immunreaktivitesinin, diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği (P<0.001) yönündedir.

9- Bir mm^2 interstisyel alandaki INSL3 immünpozitif Leydig hücre sayısının; diyabet ve arı sütü grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı (sırasıyla P<0.001, P<0.001); ancak arı sütü ve diyabet grubu değerleri arasında yapılan karşılaştırma sonucunda, elde edilen artışın (P=0.008), istatistiksel olarak anlamlı olması, bu çalışmanın en önemli sonucudur.

Deneysel diyabet oluşturduğumuz çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm bu sonuçlarla; diyabetik erkek bireylerde karşılaşılan subfertilite ve/veya infertilite olgularında, doğal bir antioksidan olan arı sütü kullanımının, önemli bir katkı sağlayacağı ve bu fonksiyonu da Leydig hücrelerine olan etkisiyle gerçekleştirebileceği yönünde bir görüşe varılmıştır.

ÖZET

Günümüzde diyabetik erkek bireylerin subfertilite ve/veya infertilitesi dikkat çeken bir konu olduğundan, üzerinde sıklıkla araştırma yapılan bir konu haline gelmiştir. Diyabetik erkeklerde subfertilite veya infertiliteye neden olan, diyabetik testis dokusunda ortaya çıkan histopatolojik değişikliklerden en önemlisi artmış apoptozisdir. Bu çalışmada, diyabetik sıçan testis dokularında arı sütünün; Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick and labeling (TUNEL) tekniği kullanılarak apoptozis, prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) kullanılarak proliferasyon ve insulin benzeri faktör 3 (INSL3) kullanılarak da Leydig hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi ve böylece diyabetik erkek infertilitesine, arı sütünün olası iyileştirici etkisine göre, yeni tedavi protokollerinin belirlenmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Stabil laboratuvar koşulları altında tuttuğumuz *Wistar albino* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=6), tek doz 50 mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=8) ve tek doz 50mg/kg streptozotosin uygulandıktan sonra 400mg/kg/gün arı sütü verilen grup (n=6) olmak üzere üç grup oluşturulmuştur. Diyabet grubuna göre, diyabet oluşturulduktan sonra arı sütü verilen grupta; testis ağırlık ($P=0.044$), testis uzunluk ($P=0.026$) ve seminifer tübül çaplarının ($P<0.001$) istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir.

Diyabet grubuna göre arı sütü grubu proliferasyon indeksi ($P<0.001$) istatistiksel anlamlılıkla artarken; apoptotik tübül ($P<0.001$) ve apoptotik hücre ($P<0.001$) indekslerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücre sayısının INSL3 immunreaktivitesi ile belirlendiği bu çalışmada; diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, arı sütü verilen grupta Leydig hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı (P=0.008) gözlenmiştir.

Sonuç olarak; diyabetin sebep olduğu erkek infertilitesinde, arı sütünün koruyucu etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Testis, INSL3, PCNA, Apoptozis

EFFECT OF ROYAL JELLY ON APOPTOSIS, PROLIFERATION AND IMMUNOREACTIVY OF INSL3 IN RAT DIABETIC TESTES TISSUE

SUMMARY

Subfertility or infertility in diabetic male has become a major problem recently. One of the most important histopathological changes in the diabetic testicular tissue are apoptosis. We aimed to contribute the identification of new treatment protocols based on the possible therapeutic effect of royal jelly using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) for apoptosis, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) for proliferation and insulin-like factor 3 (INSL3) for Leydig cell function in diabetic testicular tissue.

Twenty *Wistar albino* male rats under stable laboratory conditions were divided into three groups. The groups were designated as the control group (n=6), the diabetic group (n=8) was administered a single dose 50 mg/kg of streptozotocin and royal jelly group (n=6) given 400 mg/kg/day royal jelly after a single dose of 50 mg/kg streptozotocin. Testicular weights (P=0.044), testis lengths (P=0.026) and seminiferous tubule diameters (P <0.001) were significantly higher in royal jelly group compared to the diabetic group.

While proliferation index (P <0.001) were significantly increased, apoptotic tubule indices (P <0.001) and apoptotic cell indices (P <0.001) were significantly decreased in the royal jelly group compared to the diabetic group.

The number of INSL3 immunopositive cells (P =0.026) was significantly increased in the royal jelly groups compared to the diabetic group.

As a result, we believe that the protective effect of royal jelly may be effective in preventing male subfertility/infertility caused by diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, Testes, INSL3, PCNA, Apoptozis

KAYNAKLAR

1. http://www.saglik.gov.tr/HM/dosya/1-71375/h/turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-%20rogrami.pdf. 20.06.2017 tarihinde erişildi.

2. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. Biochim Biophys Acta 2013;1832(5):626-35.

3. Altay B, Cetinkalp S, Doganavsargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. Fertil Steril 2003;80:828-31.

4. Anderson JE, Thliveris JA. Testicular histology in streptozotocin-induced diabetes. Anat Rec 1986;214(4):378-82.

5. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. Curr Diabetes Rev 2014;10(3):147-57.

6. Bayram S, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis. Biotech Histochem 2016;91(3):204-11.

7. Orman D, Vardi N, Ates B, Taslidere E, Elbe H. Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubules damage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Tissue and Cell 2015;47(3):284-90.

8. Karaca T, Demirtas S, Karaboga I, Ayvazz S. Protective effects of royal jelly against testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Turk J Med Sci 2015;45(1):27-32.

9. Howland BE, Zebrowski EJ. Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. Horm Metab Res 1976;8(6):465-9.

10. Donmez YB, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. Acta Cir Bras 2014;29(10):644-50.

11. Ersoy O. Diyabetik Sıçanların Testis Dokularında Fukoidan Etkilerinin Araştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2016.

12. Belviranli M, Gokbel H, Okudan N, Buyukbas S. Effects of grape seed extract on oxidative stress and antioxidant defense markers in streptozotocin-induced diabetic rats. Turk J Med Sci 2015;45(3):489-95.

13. Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, Sakly M. Protective effect of lavandula stoechas and rosmarinus officinalis essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. J Med Food 2015;18(2):241-9.

14. Ghanbari E, Nejati V, Najafi G, Khazaei M, Babaei M. Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J of Fer Ste 2015;9(1):113-20.

15. Mobasseri M, Ghiyasvand S, Ostadrahimi A, Ghojazadeh M, Noshad H, Pourmoradian S. Effect of fresh royal jelly ingestion on glycemic response in patients with type 2 diabetes. Iran Red Crescent Med J 2015;17(9):20074.

16. Fujii A, Kobayashi S, Kuboyama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, et al. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. Jpn J Pharmacol 1990;53(3):331-7.

17. Matsui T, Yukiyoshi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, Matsumoto K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. J of Nutritional Biochemistry 2002;13(2):80-6.

18. Tamura T, Fujii A, Kuboyama N. Antitumor effects of royal jelly (Rj). Folia Pharmaco Japonica 1987;89(2):73-80.

19. Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. Life Sci 2003;73(16):2029-45.

20. Eshraghi S, Seifollahi F. Antibacterial effects of royal jelly on different strains of bacteria. Iranian J Publ Health 2003;32(1):25-30.

21. Bachanova K, Klaudiny J, Kopernicky J, Simuth J. Identification of honeybee peptide active against Paenibacillus larvae larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. Apidologie 2002;33(3):259-69.

22. Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chemistry 2001;75(2):237-40.

23. Reddy P, Duggar B, Butterworth J. Blood glucose management in the patient undergoing cardiac surgery: A review. World J Cardiol 2014;6(11):1209-17.

24. Tas S, Sarandol E, Dirican M. Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. The Sci World J 2014;2014:351598.

25. Hu C, Su Q, Li F, Zhang G, Sun D, Han H, et al. Duodenal-Jejunal bypass improves glucose homeostasis in association with decreased proinflammatory response and activation of JNK in the liver and adipose tissue in a T2DM rat model. Obes Surg 2014;24(9):1453-62.

26. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2015;38:8-16.

27. International Diabetes Federation (IDF). Diabetes atlas, 7th edition 2015. http://www.diabetesatlas.org/diabetesatlas 20.06.2017 tarihinde erişildi.

28. Karakurt F, Carlioglu A, Kasapoglu B, Gumus II. Gestasyonel diabetes mellitus tanı ve tedavisi. Yeni Tıp Derg 2009;26:134-8.

29. Kurcer Z, Karaoglu D. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. Turk Jem 2012;16:34-40.

30. Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus physiology and pathology. J Surg Res 1983;35(5):433-60.

31. Yıldırım M. İnsan Anatomisi. Erkek üreme sistemi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2000. s.224-35.

32. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. Erkek üreme sistemi. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi;2009. s.253-64.

33. Sadler TW. Langman medikal embriyoloji (çeviri: AC. Başaklar). Ürogenital sistem. Ankara: Palme Yayıncılık;2011. s.246-8.

34. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Dalçık H, Yıldırım M. (Editörler). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2009. s.175-8.

35. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B. (Editör). Erkek üreme sistemi. İstanbul: Palme Yayıncılık;2013. s.784-829.

36. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji Text and Atlas. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Editörler). Erkek üreme sistemi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2009. s.418-33.

37. Shirneshan K, Binder S, Bohm D, Wolf S, Sancken U, Meinhardt A, et al. Directed overexpression of insulin in Leydig cells causes a progressive loss of germ cells. Mol Cell Endocrinol 2008;295(1-2):79-86.

38. Ermetici F, Donadio F, Iorio L, Malavazos AE, Dolci A, Peverelli E, et al. Peripheral insulin-like factor 3 concentrations are reduced in men with type 2 diabetes mellitus: effect of glycemic control and visceral adiposity on Leydig cell function. Eur J Endocrinol 2009;161(6):853-9.

39. Ivell R, Anand-Ivell R. Biological role and clinical significance of insulin-like peptide 3. Curr Opin Endocrinol 2011;18(3):210-6.

40. Valeri C, Schteingart HF, Rey RA. The prepubertal testis: biomarkers and functions. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2013;20(3):224-33.

41. Overvad S, Bay K, Bojesen A, Gravholt CH. Low INSL3 in Klinefelter syndrome is related to osteocalcin, testosterone treatment and body composition, as well as measures of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Andrology-Us 2014;2(3):421-7.

42. Agras K. İnmemiş testiste embriyoloji ve testiküler iniş mekanizmaları. Turk Urol Sem 2012;3:17-22.

43. Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G. Ratlara cisplatin verilmesi nedeniyle oluşan sperm karakteristikleri, testiküler hasar ve oksidatif stres üzerine arı sütünün koruyucu rolünün belirlenmesi. TÜBİTAK; 2007 Haz. Proje no: 1060203.

44. https://netmola.com/ari-sutu-nedir 20.06.2017 tarihinde erişildi.

45. Koseoglu M, Yucel B, Gokbulut C, Konak R, Bircan C. Hasat zamanının arı sütünün kimi biyokimyasal ve iz element kompozisyonları üzerine etkisi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013;19(2):233-7.

46. http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076e16.htm 20.06.2017 tarihinde erişildi.

47. Lercker G, Capella P, Conte LS, Ruini F. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. Lipids 1981;16(12):912-9.

48. Takenaka T, Yatsunami K, Echigo T. Changes in quality of royal jelly during storage. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 1986;33(1):1-7.

49. Karaca T, Bayiroglu F, Yoruk M, Kaya MS, Uslu S, Comba B, et al. Effect of royal jelly on experimental colitis Induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats. Eur J Histochem 2010;54(4):193-6.

50. Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, Silici S, Liman BC, Altinordulu S, et al. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. Exp Toxicol Pathol 2009;61(2):123-32.

51. https://www.tse.org.tr/upload/tr/dosya/icerikyonetimi/531/16102014133752-1.pdf 20.06.2017 tarihinde erişildi.

52. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. J Funct Foods 2012;4(1):39-52.

53. Blum MS, Novak AF, Taber S. 10- Hydroxy-A2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. Sci 1959;130(3373):452-3.

54. Korkmaz A, Ozturk C. Arı Sütü. Samsun: TC Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü, 2010:8-9.

55. Abdelhafiz AT, Muhamad JA. Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility. Int J Gynaecol Obstet 2008;101(2):146-9.

56. Karacal-Tamamogullari F, Aral F, Demirkol R. Erkek farelerde arı sütünün uzun süreli uygulanmasının bazı spermatolojik özellikler üzerine etkisi. Fırat Uni Sağ Bil Derg 2006;20(5):341-4.

57. Hassan AA. Effect of royal jelly on sexual efficiency in adult male rats. Iranqi J of Vet Sci 2009;23:155-60.

58. Elnagar SA. Royal jelly counteracts bucks' "summer infertility". Anim Reprod Sci 2010;121(1-2):174-80.

59. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. J Androl 2012;33(2):145-53.

60. Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF-beta1, IL-1beta and Akt signalling. Cell Biochem Funct 2014;32(1):115-24.

61. Malavige LS, Jayaratne SD, Kathriarachchi ST, Sivayogan S, Fernando DJ, Levy JC. Erectile dysfunction among men with diabetes is strongly associated with premature ejaculation and reduced libido. J Sex Med 2008;5(9):2125-34.

62. Trindade AA, Simoes AC, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT. Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. Acta Cir Bras 2013;28(4):256-65.

63. Gurusubramanian G, Roy VK. Expression of visfatin in alloxan-induced diabetic rat testis. Acta Histochem 2014;116(8):1462-8.

64. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. Theriogenology 2006;66(9):2056-67.

65. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. Iran J Basic Med Sci 2012;15(1):623-35.

66. Ballester J, Dominguez J, Munoz MC, Sensat M, Rigau T, Guinovart JJ, et al. Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. J Androl 2005;26(6):706-15.

67. Jain GC, Jangir RN. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. Pharmacogn Rev 2014;8(16):113-21.

68. Kushwaha S, Jena GB. Telmisartan ameliorates germ cell toxicity in the STZ-induced diabetic rat: studies on possible molecular mechanisms. Mutat Res 2013;755(1):11-23.

69. Guo Z, Yan X, Wang L, Wu J, Jing X, Liu J. Effect of Telmisartan or Insulin on the Expression of Adiponectin and its Receptors in the Testis of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Hormone and Metabolic Research 2016;48(6):404-12.

70. Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG. The Antiapoptotic Effects of Sulphurous Mineral Water and Sodium Hydrosulphide on Diabetic Rat Testes. Cell Physiol Biochem 2011;28(5):887-98.

71. Zhang W, Wang Y, Yang Z, Qiu J, Ma J, Zhao Z, et al. Antioxidant treatment with quercetin ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. J Biosci Bioeng 2011;112(3):215-8.

72. Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. Peptides 2015;63:47-54.

73. Yoshida M, Hayashi K, Watadani R, Okano Y, Tanimura K, Kotoh J, et al. Royal jelly improves hyperglycemia in obese/diabetic KK-Ay mice. J Vet Med Sci 2017;79(2):299-307.

74. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. Reprod Toxicol 2007;23(4):578-87.

75. Kushwaha S, Jena GB. Enalapril reduces germ cell toxicity in streptozotocin-induced diabetic rat: investigation on possible mechanisms. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2012;385(2):111-24.

76. Koh PO. Streptozotosin-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.

77. Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi S, Nejati V. Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. Avicenna J Phytomed 2013;3(4):347-55.

78. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum Reprod Update 2008;14(3):243-58.

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

80. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, et al. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor Beta and vascular endothelial growth factor. Dis Markers 2014;2014:108106.

81. Bal R, Turk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Ozercan I, Kuloglu T, et al. Protective effects of nanostructures of hydrated C(60) fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. Toxicology 2011;282(3):69-81.

82. Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. Urol Res 2000;28:342-7.

83. Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M. Antioxidant and protective effects of Royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats. Int J Reprod Biomed 2016;14(8):519-26.

84. Öztürk F, Gül M, Agkadir M, Yagmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. Türkiye Kli Tıp Bil 2002;22:173-8.

85. Koh PO. Streptozotosin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testis. J Vet Med Sci 2002;69:969-71.

86. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and Sterility 2003;79(4):829-43.

87. Li X, Li B, Gao H, Cheng M, Xu L, Li X, et al. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on aortic pulse wave velocity in streptozocin induced diabetic rats. Biosci Biotechnol Biochem 2009;73:1348-54.

88. Hu JH, Jiang J, Ma YH, Yang N, Zhang MH, Wu M et al. Enhancement of germ cell apoptosis induced by ethanol in transgenic mice overexpressing Fas Ligand. Cell Res 2003;13:361-7.

89. Yin Y, DeWolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. Biol Reprod 1998;58(2):492-6.

90. Foresta C, Bettella A, Vinanzi C, Dabrilli P, Meriggiola MC, Garolla A, et al. A novel circulating hormone of testis origin in humans. J Clin Endocrinol Metab 2004;89(12):5952-8.

91. Burkhardt E, Adham IM, Hobohm U, Murphy D, Sander C, Engel W. A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley I-L). Hum Genet 1994;94(1):91-4.

92. Bay K, Hartung S, Ivell R, Schumacher M, Jurgensen D, Jorgensen N, et al. Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. J Clin Endocrinol Metab 2005;90(6):3410-8.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hipofiz-testis ekseni ……9
Şekil 2: Bal peteği içine salgılanan arı sütü 10
Şekil 3: 10-HDA kimyasal yapısı 12
Şekil 4: Kontrol grubu, H+E, X200 23
Şekil 5: Kontrol grubu, H+E, X400 23
Şekil 6: Diyabet grubu, H+E, X200 24
Şekil 7: Diyabet grubu, H+E, X200 25
Şekil 8: Diyabet grubu, H+E, X400 25
Şekil 9: Diyabet grubu, H+E, X400 26
Şekil 10: Arı sütü grubu, H+E, X100.....27
Şekil 11: Arı sütü grubu, H+E, X200.....27
Şekil 12: Arı sütü grubu, H+E, X400.....28
Şekil 13: Arı sütü grubu, H+E, X400.....28
Şekil 14: Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200 30
Şekil 15: Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X400 30
Şekil 16: Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X100 31
Şekil 17: Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200 31
Şekil 18: Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X400 32
Şekil 19: Arı sütü grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X100 32
Şekil 20: Arı sütü grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X200 33
Şekil 21: Arı sütü grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyaması, X400 33

Şekil 22: Kontrol grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X200 35
Şekil 23: Kontrol grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X400 35
Şekil 24: Diyabet grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X200 36
Şekil 25: Diyabet grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X400 36
Şekil 26: Arı sütü grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X200.....37
Şekil 27: Arı sütü grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyaması, X400.....37
Şekil 28: Kontrol grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X200 38
Şekil 29: Kontrol grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X400 39
Şekil 30: Kontrol grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X400 39
Şekil 31: Diyabet grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X200.....40
Şekil 32: Diyabet grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X400.....40
Şekil 33: Diyabet grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X400.....41
Şekil 34: Arı sütü grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X200.....41
Şekil 35: Arı sütü grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X400.....42
Şekil 36: Arı sütü grubu, INSL3, hematoksilen zıt boyaması, X400.....42

TABLOLAR

Tablo 1. Kan glukoz ve testosteron düzeyi değerleri …….20
Tablo 2. Vücut ve testis ağırlık değerleri…….……...20
Tablo 3. Seminifer tübül çapı, testis uzunluk ve genişlik değerleri……..…….21
Tablo 4. Apoptotik tübül ve apoptotik hücre indeksleri……..……..29
Tablo 5. PCNA (Proliferasyon indeksi) ve INSL3 immünreaktivite değerleri..……34

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında, Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde doğdum. İlk ve ortaöğretimini Çorlu da tamamladıktan sonra, 2009 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldum. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım.

EKLER

Ek-1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2016/07 **Karar Tarihi: 29.06.2016**

KARAR NO: 2016.07.04

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın yaptığı, Şirin YAVAŞ'ın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2016/38 protokol nolu "**Arı sütünün diyabetik sıçan testis dokularındaki apoptoz, proliferasyon ve INSL3 immunreaktivitelerine etkisi**" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ek-2