

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

N-ASETİLSİSTEİN'İN DİYABETİK SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA
TRANSİENT RESEPTÖR POTANSİYEL MELASTATİN 2 (TRPM2)
KANALLARININ EKSPRESYONUNA ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: AHMET TÜRK

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. TUNCAY KULOĞLU

ELAZIĞ-2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emre Özcan
[Signature]

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

[Signature]

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Emre ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

Doç. Dr. Selçuk İLHAN

.....

[Signature]
[Signature]
[Signature]

İTHAF SAYFASI

Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLUNA 'na

Eğitimim süresince beni yönlendiren, manevi desteğini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Enver OZAN'a, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU'na, Doç.Dr. Özlem Durrin DABAK'a ve Yrd Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a, Arş. Görevlisi Nalan Kaya'ya ve tezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne, manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	i
İTHAF SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1.ÖZET	1
2. ABSTRACT	1
3. GİRİŞ	3
3.1. Testis Anatomisi	3
3.2. Testis Embriyolojisi	5
3.3. Testis Histolojisi	6
3.3.1. Seminifer Tübüller	8
3.3.2. Spermatogenez.....	11
3.3.3. Spermiyogenez.....	12
3.3.4. Sertoli Hücreleri.....	13
3.3.5. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri.....	14
3.4. Testis Fizyolojisi	16
3.5. Diabetes Mellitus	17
3.5.1. Epidemiyoloji.....	17

3.5.2. Diabetes Mellitus'un Tanı ve Sınıflaması	18
3.5.2.1 DM'nin Etiyolojik Sınıflandırılması.....	19
3.5.2.1.1. Diğer Spesifik Tipler.....	20
3.5.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	20
3.6. Serbest Radikaller	21
3.7. Oksidatif Stres.....	24
3.8. Diabetes Mellitus Oksidatif Stres ve Gelişen Komplikasyonlar	25
3.9. Diyabet ve Testis.....	26
3.10. Antioksidanlar	27
3.10.1. Antioksidan Mekanizmalar.....	27
3.10.2. N-Asetilsistein (NAS).....	29
3.11. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri	31
3.12. Hücre Zarı Kanalları	31
3.12.1 Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalı ve Ailesi	32
3.12.2. Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM)	35
3.12.2.1 Transient Receptor Potential Melastatin2 (TRPM2)	36
3.12.2.1.1. TRPM2 Kanal Aktivasyonunda Diyabet ve Oksidatif Stresin Rolü.....	39
3.13. Apoptozis	39
3.13.1. Apoptozun Testisler Üzerindeki Etkisi.....	41
3.13.2. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	42
3.13.3. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	43
3.13.3.1. TUNEL Yöntemi(TdT-mediated Nick and Labeling Technique) 43	

4. GEREÇ VE YÖNTEM	45
4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri.....	45
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	46
4.3. Diyabet İndüksiyonu.....	47
4.4. Doku Örneklerinin Alınması.....	47
4.5. Malondialdehid (MDA) Çalışması.....	49
4.6. TUNEL Metodu.....	50
4.7. İmmünohistokimyasal İnceleme.....	52
4.8. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Metodu.....	54
4.9. İstatistiksel Analiz.....	58
5. BULGULAR	59
5.1. MDA Bulguları.....	59
5.2. TUNEL Bulguları.....	59
5.3. TRPM2 İmmünreaktivitesi.....	63
5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bulguları.....	67
6. TARTIŞMA	68
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. DM'nin tanı kriterleri	19
Tablo 2. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları	20
Tablo 3. Yapısal özelliklerine göre antioksidanların ve alt gruplarının gösterilmesi	29
Tablo 4. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	43
Tablo 5. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin ترکیبی	46
Tablo 6. Histolojik takip serileri	48
Tablo 7. TUNEL boyama prosedürü.	51
Tablo 8. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	53
Tablo 9. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi	54
Tablo 10. cDNA karışım miktarı	56
Tablo 11. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	56
Tablo 12. RT-PZR'da kullanılan primerler	57
Tablo 13. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	57
Tablo 14. Uygulanan RT-PZR programı	58
Tablo 15. Doku MDA değerleri	59
Tablo 16. Apoptotik indeks (%)	60
Tablo 17. TRPM2 immünreaktivitesi	64
Tablo 18. TRPM2 mRNA düzeyleri.	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnsan testisinin midsagittal kesiti.....	4
Şekil 2. Erkek genital sistem şeması.....	8
Şekil 3. Testisin genel histolojik yapısı.	9
Şekil 4. Çevreleyen doku ile birlikte semnifer tübülün bir parçası.....	10
Şekil 5. Seminifer tübülün genel görünümü	12
Şekil 6. Seminifer tübülün genel görünümü ve sertoli hücreleri hücreleri	14
Şekil 7. Seminifer tübülün genel görünümü ve leydig hücreleri	15
Şekil 8. Diyabette glukoz toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin beta hücrelerindeki moleküler mekanizması	26
Şekil 9. N-Asetilsistein moleküler formülü şematik gösterimi.....	29
Şekil 10. TRP reseptör alt-biriminin moleküler modeli	33
Şekil 11. TRP ailesi şematik gösterimi	35
Şekil 12. TRPM2 kanalının moleküler yapısı.....	37
Şekil 13. TUNEL metodu uygulanmış rat testis dokusunda kahverengi boyanmış apoptotik hücreler.....	44
Şekil 14. Kontrol grubu TUNEL pozitif hücre	61
Şekil 15. NAS grubu TUNEL pozitif hücre	61
Şekil 16. DM grubu testis dokusunda artmış TUNEL pozitif hücreler	62
Şekil 17. DM+NAS grubu TUNEL pozitif hücreler.....	62
Şekil 18. Negatif kontrol. TUNEL Testis dokusu	63
Şekil 19. Pozitif kontrol. TUNEL Meme dokusu	63
Şekil 20. Kontrol grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.	65
Şekil 21. NAS grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.....	65

Şekil 22. DM grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.	66
Şekil 23. DM+NAS grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi. ...	66

KISALTMALAR LİSTESİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
ADP	: Adenozin Difosfat
ADPR	: Adenozin Difosforiboz
AKG	: Arka Kök Ganglion
AIF	: Apoptoz Uyarıcı Faktör
AMH	: Anti Müllerian Hormonu
AMP	: Adenozin Monofosfat
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Faktor 1
ATP	: Adenozin Trifosfat
β-NAD	: β eta-nikodinamin adenin dinükleotid
BSO	: Bütiyonin sülfoksimin
Ca^{+2}	: Kalsiyum
cADPR	: Siklik ADPR
CAM	: Kalmodulin
DAB	: Diaminobenzidine
DAG	: Diasilgliseroller
d-ATP	: Ko-faktor nukleotid trifosfat d-ATP
DKA	: Diyabetik ketoasidoz
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E.R	: Endoplazmik retikulum

FADD	: Fas Bağımlı Ölüm Domain Proteinini
FFA	: Flufenomik Asit
FSH	: Fölikül uyarıcı hormonu
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
G6PD	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
GDM	: Gestasyonel Diyabet
GH	: Büyüme Hormonu
GnRH	: Gonadotropin-Serbestleştirici Hormon
GR	: Glutasyon Redüktaz
GrB	: Granzim-B
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH-Rd	: Glutasyon Redüktaz
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropini Hormonu
HHS	: Hiperosmolar Hiperglisemik Sendrom
HOCl	: Hipoklorik Asid
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IFG	: Bozulmuş Açlık Glukozu
IGT	: Glukoz Tolerans Bozukluğu
IGF-I	: Büyüme Faktörü-1

İ.P	: İntra Peritonal
İP	: Fosfoinositler
K-ATP	: ATP-Potasyum Kanalı
KAT	: Katalaz
KB	: Kilo Baz Çiftleri
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LH	: Luteinizan Hormonunu
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehid
Na⁺	: Sodyum
NAS	: N-Asetilsistein
NAADP	: Nikodinik Asit Adenindinükleotid
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O₃	: Ozon (O3)
1O₂	: Singlet Oksijen
OAADPR	: O-Asetil-ADPR
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
ONOO	: Perksinitrit
PBS	: Fosfat tamponu
PKA	: Protein kinaz-A
PLC	: Fosfolipaz-C
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Serbest Oksijen Radikallerine

RT-PZR	: Real Time - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
SRY	: Y kromozomu üzerindeki seks belirleyici bölge
STZ	: Streptozotosin
TBA	: Tiyobarbiturik Asit
TCA	: Triklometik Asit
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
TNF	: Tumor Nekroz Faktör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel
TRPA	: Transient Reseptör Potansiyel Ankirin
TRPC	: Transient Reseptör Potansiyel Kanonik
TRPM	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin
TRPM1	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin1
TRPM2	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin2
TRPM3	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin3
TRPM4	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin4
TRPM5	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin5
TRPM6	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin6
TRPM7	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin7
TRPM8	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin8
TRPML	: Transient Reseptör Potansiyel Mucolipin
TRPN(NOMPC)	: TRPN(NOMPC)Non mekanoreseptör potansiyel-c
TRPP	: Transient Reseptör Potansiyel Polisin

TRPV	: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid
TUNEL	: TdT- Mediated Nick and Labeling Technique
TURDEP	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması
VGCC	: Kalsiyum Voltaj Kanalı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1.ÖZET

Amaç: Diabetes mellitus (DM), mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabetik erkeklerde, artmış oksidatif strese bağlı olarak testislerde germ hücrelerinde apoptozisde artış meydana gelmekte ve testiküler fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır. N-Asetilsistein (NAS), sülfidril grubu içeren bir molekül olup antioksidan özellik göstermektedir.

Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde NAS'ın, sıçan testis dokusundaki apoptotik değişiklikler ve Transient Reseptör Potansiyel Melastatin2 (TRPM2) kanal ekspresyonuna etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 28 adet 8-10 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak biçimde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 8 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. NAS grubuna 100mg/kg/gün NAS intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Diyabet grubuna tek doz 50 mg/kg streptozotosin (STZ) fosfat-sitrat tamponunda çözülürerek i.p olarak uygulandı. Diyabet + NAS grubuna ise 50 mg/kg STZ i.p olarak uygulanmasından sonra diyabetin oluşumunu takiben NAS 100 mg/kg/gün i.p olarak verildi. Deney sonunda sıçanlar anestezi altında dekapite edildi ve testis dokuları çıkartıldı. MDA ve TRPM2 mRNA düzeyleri için testis dokuları çalışmanın sonuna kadar -80°C 'de saklandı. Histolojik çalışma için rutin takip işlemi ile dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan kesitlere apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL metodu, TRPM2 immünreaktivitesi için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı.

Bulgular: Çalışmamızda kontrol grubu ile NAS grubu arasında bakılan parametrelerde anlamlı bir farklılık yoktu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabetik grupta MDA ve apoptozis anlamlı olarak artmış iken TRPM2 seviyesi azalmıştı. Diyabetik grup ile karşılaştırıldığında Diyabet + NAS grubunda ise MDA ve apoptozis anlamlı olarak azalmış iken TRPM2 seviyesi artmıştı.

Sonuç: Sonuç olarak, deneysel diyabetin testis dokusunda MDA ve apoptotik hücreleri arttırdığı, TRPM2 seviyelerini azalttığı, tedavi olarak verilen NAS'ın MDA ve apoptotik hücreleri azalttığı görüldü. Diyabetin testis dokusunu etkilemesinin patofizyolojisindeki rolünün aydınlatılabilmesi için gelecekte farklı deneysel diyabet süreleriyle yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, NAS, Testis, TRPM2, Sıçan.

2. ABSTRACT

EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON EXPRESSION OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL MELASTATIN2 (TRPM2) CHANNELS IN DIABETIC RAT TESTICULAR TISSUE

Objective: Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by microvascular and macrovascular complications. At diabetic males, apoptosis increases at germ cells in testes due to increased oxidative stress and testicular dysfunctions occurs. N-acetylcysteine (NAC), is a molecule containing sulfhydryl groups exhibits antioxidant properties.

The aim of this study is determine the effects of NAC on apoptotic changes and transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) expression in the rat testis tissue at STZ induced DM.

Material and Method: We used 28 male 8-10 weeks old Wistar albino rats. Rats were divided into 4 groups each contains 7 rats. No application was made to control group 8 weeks. To NAS group, 100mg/kg NAC was enjected intraperitoneally (ip) . To diabetic group 50 mg/kg streptozocin (STZ) that was dissolved in phosphate-citrate buffer was injected. In diabetes + NAC group, 50 mg/kg STZ was injected and NAC was given 100 mg/kg/day orally after confirmed of diabetes. Finally rats were decapitated and testis tissues were removed. For MDA and TRPM2 mRNA levels, the testicular tissues were stored at 80 C until the end of study. With routine procedures, tissues were embedded in paraffine blockes. For detecting apoptotic cells TUNEL method and for TRPM2 immunreactivity “avidin-biotin-peroxidase” method was applied.

Results: In our study there were no significant differences about analyzed parameters between NAC group and the control group. Compared with control

group MDA and apoptosis were increased significantly at diabetic group but TRPM2 levels were decreased. Compared with diabetic group MDA and apoptosis were decreased significantly at diabet+NAC group but TRPM2 levels were increased.

Conclusion: As a result, experimental diabetes increases MDA and apoptotic cells, decreases TRPM2 levels at testis tissue, administration of NAC as treatment decreases MDA and apoptotic cells. We concluded, more experimental studies with different duration of diabetes are needed to clarify the effects of diabetes in the pathophysiology of testicular tissue damage.

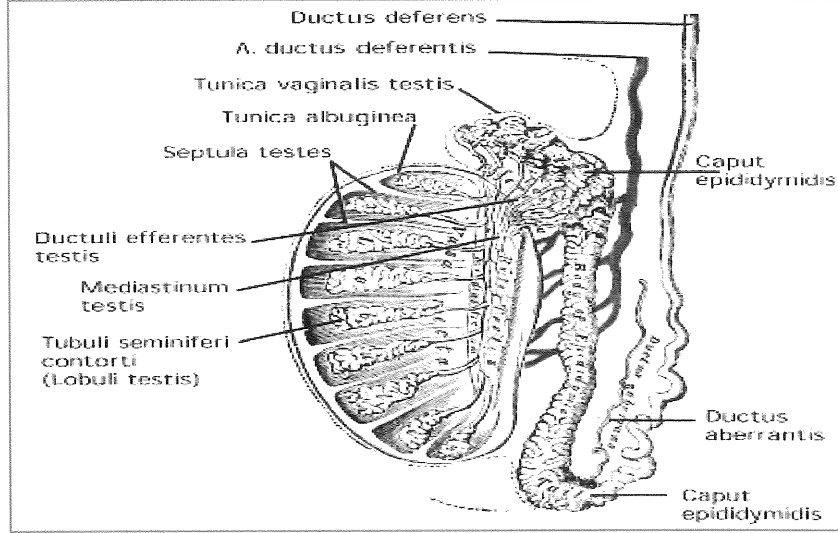
Key words: Diabetes mellitus, NAC Testis, TRPM2, Rat

3. GİRİŞ

3.1. Testis Anatomisi

Testis skrotum içinde yer alan erkek üreme hücrelerinin yapıldığı bir çift organdır. Testisler elips şeklinde olup skrotum içinde oblik pozisyonunda durmakta olup üst ucu öne ve dışa alt ucu ise arkaya ve öne doğru bakar. Testislerin facies medialis ve facies lateralis adı verilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı extremitas superior ve extremitas inferior adı verilen iki ucu vardır. Testisler funiculus spermaticus aracılığıyla skrotum içinde asılı durumdadır (1). Testisler yanlardan basık oval şekildedir 4,5 cm boy, 2.5 cm genişlik, 3 cm anteroposterior çap gösterir. Her biri 10-14 gr ağırlığında olan testislerden sol taraftaki sağa göre genelde 1cm daha aşağıda bulunur. Testisler, dıştan içe doğru olmak üzere tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere üç tabaka ile sarılırlar (2).

Tunica albuginea'nın üzerinde peritonun uzantısı olan tunica vaginalis yer almaktadır. Tunica vaginalis iki yapraklıdır. Anteriorda, testise yakın olan ve epididimi çevreleyen kısmına viseral tabaka, daha dışta yer alan kısmına ise paryetal tabaka adı verilir. Testis, tunica albuginea adı verilen kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu tabaka; fibroblastlar ve kollajenden yoğun bir yapıdadır. Tunica albuginea'nın altında nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, tunica vaskulosa adı verilen damarsal bir tabaka yer alır.



Şekil 1. İnsan testisinin midsagittal kesiti (3).

Burada tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Herbir lobülün içinde 1 ile 4 arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise rete testis diye isimlendirilen kanal ağına açılırlar. Rete testis, mediastinum testis'in üst bölümünde sayıları 12 ile 15 arasında değişen kanallar şekline dönüşür. Ductuli efferentes testis denilen bu kanallar, testis'in arka kenarının üst kısmında, tunica albuginea'yı delerek dışarı çıkarlar (4).

Duktus deferens, duktus deferensin arter ve veni, testiküler arter, "plexus pampiniformis", "plexus deferentialis", "processus vaginalis peritonei", "musculus cremaster", "arteria cremasterica", "vena cremasterica", lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral 4 sinirin genital dallarından Spermatik kord oluşur. Bu yapılar gevşek bir bağ dokusu ile birbirlerine bağlanmıştır. Spermatik kordu dışta ise kas lifleri ve "fascia spermatica externa", "fascia cremasterica", "fascia spermatica interna" adı verilen zarlar çevrelemiştir (5).

Böbrek arterinin 2-3 cm altından aortanın ön yüzünden çıkar testiküler bir arterdir. testikuler arter eğimli bir şekilde ilerleyerek testisin arka yüzünden tunica albugineayı tekli veya dallara ayrılmış bir halde geçmekte olup daha sonra bu dallarda kollara ayrılarak seminifer tübüller arasındaki arteriollerini oluşturmaktadır. Epididimal arterler ve kremasterik vazallarla testiküler arterin birçok bölgede birleştiği görülmüştür. Bu arterler Testisin venöz drenajı başlamakta olup testis dışındaki “plexus pampiniformis”i meydana getirmektedir. Testislerdeki bu venlerin çoğu iç kasık halkası seviyesinde birleşmektedir (6). Sağ böbrek veninin 4-5 cm kadar altından vena kava inferiora Sağ testiküler ven açılırken, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır. Testisin innervasyonu asıl olarak ve Tunika albugineanın dışında bulunan sinirler kan damarlarıyla birlikte interstisyuma ulaşırlar. Sinirsel ileti ağı sempatik postganglionik ve viseral afferent sinirlerin yardımıyla gerçekleşmektedir. Testis lenfatikleri, seminifer tübüllerin çevresindeki lenfatik kapillerlerle interlobüler septadan testis lenfatiklerini başlatmaktadır. Daha sonra spermatik kordu takip ederek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılmaktadır (6).

3.2. Testis Embriyolojisi

Gonadların ana yapısını posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu, mezodermal epitel ve embriyonik bağ dokusu oluşturmaktadır. X kromozomuna sahip oositin X veya Y kromozomuna sahip bir sperm tarafından döllenmesine bağlı olarak embriyonun kromozomal ve genetik yapısı belirlenir.

Yedinci haftaya kadar gelişimini sürdüren gonadlar XX veya XY kromozom yapısında olsa bile gonadların görünimleri bakımından birbirlerinden ayırt edilmesi oldukça güç olduğundan yedinci haftaya kadar ki gonadlara farklanmamış gonadlar adı verilmektedir (7). Bezin yüzey epitelinden gelişen sertoli hücreleri ve primitif germ hücrelerinin oluşturduğu testis kordonları 4. aydan itibaren at nalı şeklini alır. Kordonların farklılaşmasıyla birlikte kökenini mezenşim dokudan alan leydig hücreleri gelişmeye başlar ve gestasyonun 8. Haftasından itibaren testosteron sentezini gerçekleştirir. Testis kordonları puperte dönemine kadar katı ve sert bir haldedir Puberte dönemiyle birlikte kordonların lümenine açılmasıyla seminifer tübüller haline gelirler ve daha sonra rete testis tübülleriyle birleşerek duktuli eferentislere girerler.

Testisler ve mezonefroz karın arka duvarına 2. Ayın sonunda ürogenital mezenterler yardımıyla bağlanır. Bu bağlar zamanla mezonefrozun dejenere olmasıyla gonadın mezenteri haline gelmektedir. Testislerin inişini kontrol eden basmaklar henüz tam olarak aydınlatılamamış olsada normalde testisler gestasyonun yaklaşık 12. haftasında inguinal bölgeye gelir, 28. haftada inguinal kanaldan geçerek 33. haftada skrotuma ulaşırlar (8,9).

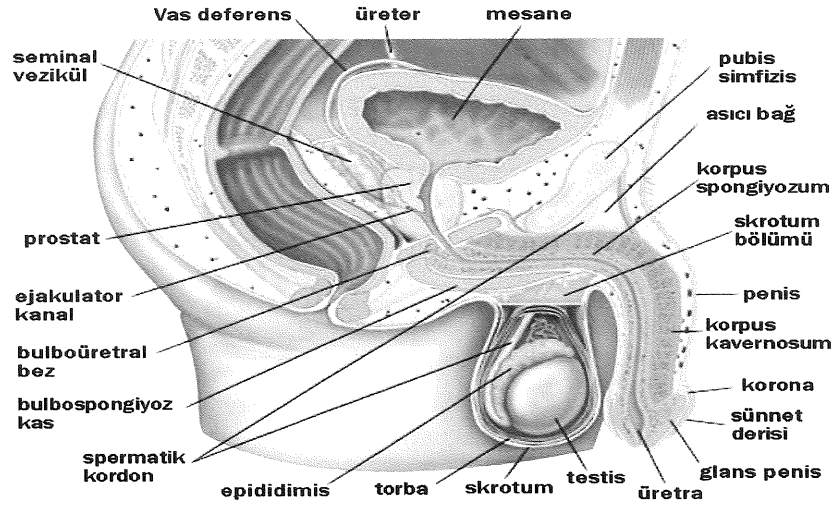
3.3.Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi testisler genital kanallar yardımcı bezler ve penisten oluşur. Testislerin başlıca iki görevi hormon ve spermatozoon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosteron olmakla birlikte erkek fizyolojisi için hem testosteron hemde metaboliti olan dihidrotestosteron gereklidir.

Spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşmada gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir. Dihidrotestosteron, ergenlik (puperte) ve erişkinlik çağlarında pek çok organ ve doku üzerinde etkilidir. Genital kanallar ve yardımcı bezler, düz kas kasılmalarının da yardımı ile spermatozoonları dışarıya sürükleyen salgılar üretir. Bu salgılar aynı zamanda erkek üreme sistemi içinde bulunan spermatozoonlara gerekli besinleri sağlarlar. Spermatozoonlar ile birlikte genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı, penis yoluyla dışı üreme sistemine bırakılan semen'i oluşturur (10). Skrotum içinde yer alan testisler, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile kuşatılmıştır. Kapsülün dış tabakası tunika vajinalis, orta tabakası tunika albuginea ve iç tabakası tunika vaskuloza olarak isimlendirilir (11).

Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle tunika vajinalis adı verilen ve peritondan gelişmiş olan seröz bir kese taşır. Tunika vajinalis dışta paryetal içte ise viseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarında tunika albugineayı örter. Skrotum, testislerin karın içinekinden daha düşük bir ısıda tutulmalarında önemli bir rol oynar. Tunica albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Bezin içine doğru uzanan fibröz septalar bu yapıyı testiküler lobuller denilen yaklaşık 250 adet pramidal bölmeye ayırır. Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbirleriyle ilişkilidir.

Her lobulde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreleri (leydig hücreleri) içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken interstisyel hücreler ise testiküler androjenleri salgırlar (10).



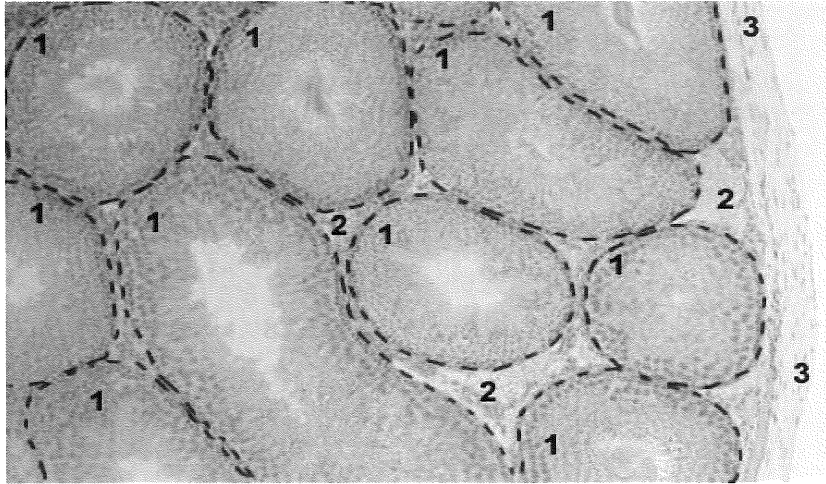
Şekil 2. Erkek genital sistem şeması (12).

Her bir testis tunika albuginea adı verilen kalın bir bağ dokusu kılıfı ile sarılı olup iç kısmı tunika vaskuloza adı verilen damardan zengin gevşek bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bağ doku tunika vaskulozadan testisin iç kısmına doğru interstisyel bağ doku adı verilen uzantılar verir. İnterstisyel bağ doku seminifer tübülleri sarar, birbirine bağlar ve onlara desteklik eder (13). Testisin en iç katmanı olan tunika vaskülosadan köken alan interstitial doku testis hacminin yaklaşık %34'ünü oluşturmakta olup fibroblast, makrofaj, mast hücreleri gibi bağ doku elemanlarını ihtiva etmektedir. Bu bağ dokusu hücreleri arasında endokrin hücreler ve testosteron sentezinden sorumlu leydig hücreleri bulunmaktadır (14).

3.3.1.Seminifer Tübüller

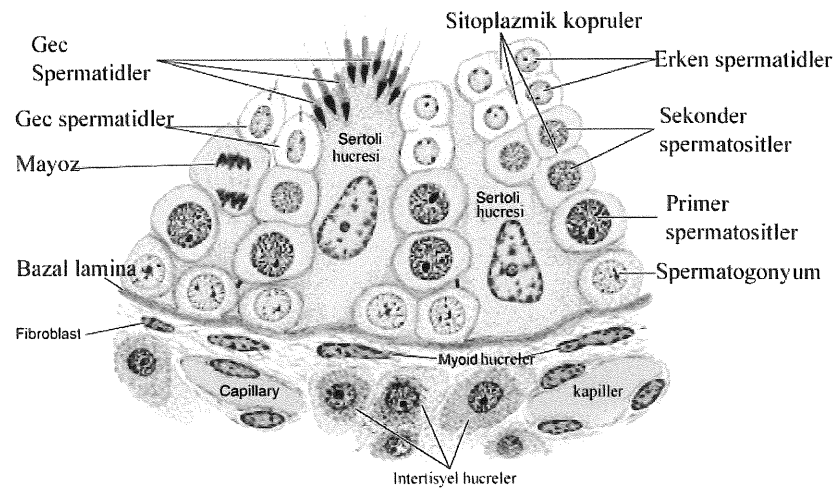
Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşelidir. Yaklaşık boyutları 150-250 µm çapında, 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller veya tubulu rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller rete testis denilen ve epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir bölüme bağlanması ile sonlanır. Anastomoz yapan rete testis kanalları yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (10).

Her bir seminifer tübülün duvarı ince bağ doku tabakası, tunika propria ve kalın seminiferöz epitelden (germinatif epitel) oluşmuştur. Tunika propria ve germinatif epitel birbirinden bazal lamina ile ayrılmışlardır. Bağ dokusunun arasında çoğunlukla fibroblastlar yerleşmiş olup ince ağ şeklinde tip 1 kollagen demetler içermektedir (11).



Şekil 3. Testisin genel histolojik yapısı 1- Seminifer tübül 2-Bağ dokusu 3- Tunika albuginea (hemotoksilen-eozin) (15).

Germinatif epitel esas iki hücre topluluğundan: sertoli hücreleri ve maturasyonun çeşitli evrelerinde olan spermatogenik hücrelerden oluşur. Sertoli hücreleri puberteye kadar germinatif epitelin dominant hücre tipidir. Puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur (16). Farklı olgunlaşma döneminde olan spermatogenik hücreler germinatif epitelin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bazal lamina ile direk bağlantılı olan hücreler, diploid kromozoma sahip spermatogonyumlar iken, adlüminal kompartmanda bulunan hücreler ise gelişmekte olan primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozondan oluşur (14).



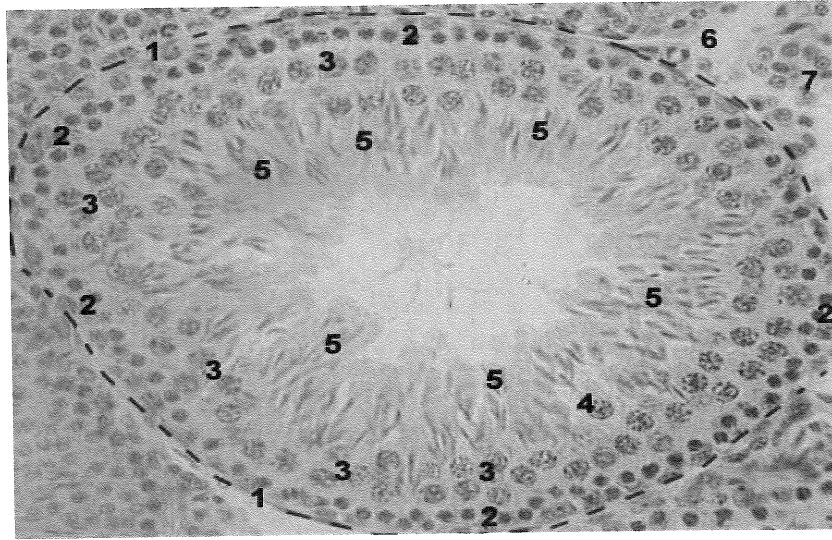
3.3.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel primitif bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir: A tipi spermatogonyumlar olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da devam eden mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar.

B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir. Primer spermatositler 46 kromozom (44+ XY) ve 4N DNA (Deoksiribonükleik Asit) içerir (N haploid kromozom sayısını insanlarda 23 kromozomu ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını gösterir). Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde gözükten spermatositlerin çoğu bu aşamada olacaktır.

Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve nükleouslarında kangal oluşturma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınır. Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22 + X veya 22+ Y) içeren daha küçük hücrelerden oluşur (14). Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin spermatositlerin oluşmasıyla sonuçlanır.

Spermatisitlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid hücreler meydana gelir böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenme ile bu hücreler normal diploid sayıya dönerler (11).



Şekil 5. Seminifer tübülün genel görünümü (Hematoksilen-Eosin)

1-Seminifer tubul, 2-Spermatogonyum, 3- Primer spermatisitler, 4- Sekonder spermatisitler, 5-Spermatidler, 6- İnterstital konnektif doku, 7- Leydig hücreleri (hemotoksilen eozin boyandı) (15).

3.3.3.Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sına ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler küçük boyutları (7-8 μm çapta) yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler.

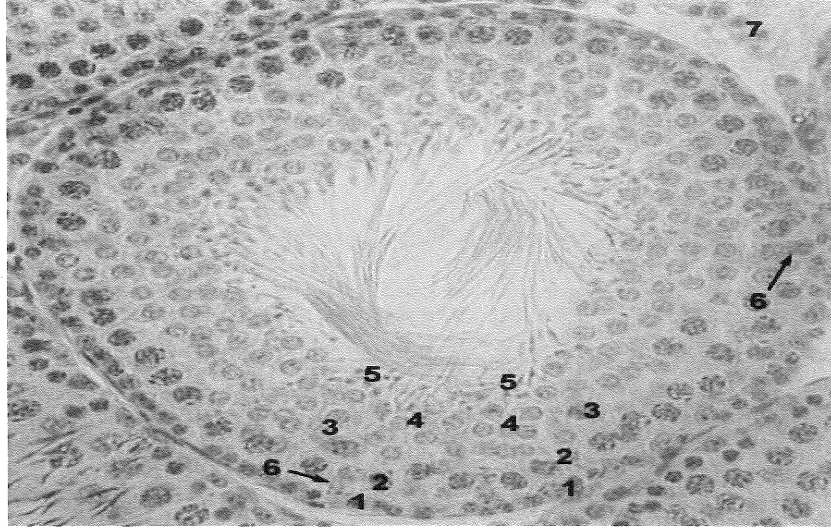
Seminifer tübüllerde lümen yakınında yerleşmişlerdir. Spermiyogenez, akrozom oluşumu, nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını flagellum gelişmesini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta daha sonra seminifer tübül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur. Spermiyogenez golgi fazı akrozomal faz ve matürasyon fazı olmak üzere 3 gruba ayrılabilir (10).

3.3.4.Sertoli Hücreleri

Prizmatik şekile sahip sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzantı yapmaktadır. Lateral mebranları arasında bulunan okludens bağlantıları vasıtasıyla sertoli hücreleri seminifer tübül lümenini iki bölüme ayırırlar. Bu bölmelerden biri geniş olup adluminal kompartman adını alırken diğer dar olan bölüm ise bazal kompartman adını almıştır. Sertoli hücrelerin bazolateral okludens bağlantıları farklı kromozom sayısına sahip germ hücrelerinin immun sistemde reaksiyon oluşturmasını engellemekte ve kan testis bariyerini oluşurmaktadır. Ayrıca sertoli hücreleri spermatik hücreleri korumakta, desteklemekte ve beslenmesinde rol oynamaktadır.

Spermiyogenezin sonunda oluşan reziduel cisimler sertoli hücreleri tarafından fagosit edilmekte olup, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemesi seminifer tübüllerde testosteron miktarını artırmaktadır. Sertoli hücrelerinde inhibin sentezlenmesine bağlı olarak  n hipofizden salgılanan f lik l uyarıcı hormonu (FSH) baskılamaktır. Sertoli hücrelerinin etkili olduğu bir başka olay ise embriyogenez döneminde anti müllerian hormonu (AMH) sentezleyerek dişi

reprodüktif sistemin öncülü olan müller kanalının baskılanması erkekte genital kanalların gelişimine yardımcı olmaktadır (14).



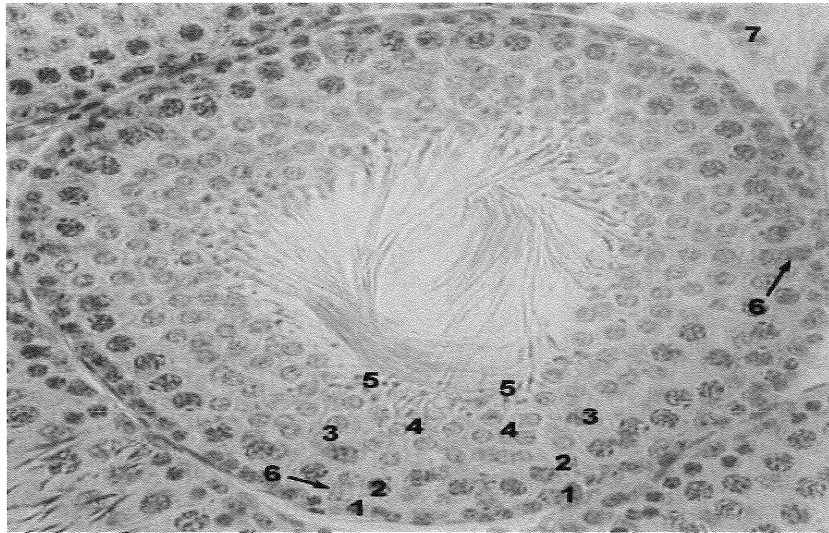
Şekil 6. Seminifer tübülün genel görünümü ve Sertoli hücreleri hücreleri

1-Seminifer tübül 2- Spermatogonium 3-Birincil spermatositler 4- İkincil spermatositler 5-Spermatid 6- Sertoli hücrelerinin çekirdekleri 7- Leydig hücreleri (hemotoksilen eozin boyandı) (15).

3.3.5. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarıyla doldurulmuştur. Testiküler kapiller bölmeli ve kan proteinleri gibi makro moleküllerin geçişine izin vermektedir. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikle birlikte bir başka hücre tipi olan leydig hücreleri işlevsel olarak daha belirgin bir hale gelir.

Oval veya çokgen şekilde görülen leydig hücrelerinin sitoplazmaları, eozinofilik ve lipit bakımından oldukça zengindir ayrıca sitoplazmalarında lipofuksin pigmenti ve çubuk şeklinde sitoplazmik kristaller olan reinke kristalleride bulunmaktadır çekirdekleri merkezde olup; mitokondrilerinde ve endoplazmik retikulumlar (E.R) da bulunan özel enzimler sayesinde testosteron üretimini gerçekleştirir. Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron, embriyonik gelişim, seksüel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için elzemdir. Leydig hücreleri fetal hayatın beşinci ayından itibaren inaktif hale geldiğinden dolayı fibroblastlardan ayırt etmek oldukça zordur. Ancak puberte ile birlikte gonadotropik stimülasyona uğrayan leydig hücreleri bu kez yaşam boyu androjen salgılayan hücreler haline gelirler ve aktif kalırlar (18).



Şekil 7. Seminifer tübülün genel görünümü ve Leydig hücreleri

1-Seminifer tubul, 2-Spermatogonyum, 3- Primer spermatositler, 4- Sekonder spermatositler, 5- Spermatidler, 6- Sertoli hücreleri, 7- Leydig hücreleri (hemotoksilen eozin boyandı) (15).

3.4. Testis Fizyolojisi

Hipotalamustan salınan gonadotropin-serbestleştirici hormon (GnRH), ön hipofiz bezini uyararak, testislerden testosteron sentezini sağlayan Luteinizan Hormonunu (LH) aktive etmektedir. Bu durum spermatogenezi etkileyerek spermatidlerin spermilere dönüşümünü sağlayan sertoli hücrelerini uyaran FSH salgılanmasına neden olmaktadır. GnRH hormonu erkek ve kadınlarda cinsel fonksiyonların düzenlenmesinde etkilidir. Spermatogenezin hormonal dengesinde FSH ile birlikte birkaç hormonda rol oynamaktadır.

Ön hipofiz bezinden salgılanan LH hormonu leydig hücreleri üzerinde meydana getirdiği etkiye bağlı olarak testosteron hormonunun sentezini meydana getirmekte ve böylece germinatif hücrelerin fizyolojik işlevlerini, yani büyüme ve bölünmelerini sağlamaktadır. Spermatogoniumların daha erken evrelerde bölünmesini sağlayan ve testislerin metabolizmasını düzenleyen büyüme hormonu (GH) spermatogenezin hormonal dengesinin kontrolünde önemli olan diğer bir hormon olup sertoli hücreleri tarafından sentezlenen inhibin hormonu da FSH salınımını baskılayarak negatif feedback oluşturduğundan spermatogenezin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca gebelik süresince LH benzeri etkiye gösteren ve plasentadan salınan insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) erkek fetüste cinsiyet organının gelişmesine yardımcı olarak spermatogenezde etkilidir (19).

3.5.Diabetes Mellitus

Heterojen bir metabolizma bozukluğu olan diabetes mellitus (DM) hiperglisemi ile karakterize edilmektedir (20). İnsülin sekresyonu veya insülinin etkisindeki bozukluklardan kaynaklanmaktadır. DM; karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ile hızlanmış aterosklerozla birlikte, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile seyreden kronik metabolik bir hastalıktır (21). Anjiopati, kardiyomiyopati, nörapati, nefropati ve retinopati DM'nin ileri dönem komplikasyonlarıdır (22).

Diyabetteki kronik hiperglisemi özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları gibi bazı organlarda uzun dönemde hasar, disfonksiyon ve yetmezliğe neden olur. Belirgin hipergliseminin semptomları poliüri, polidipsi, kilo kaybı, bazen de polifaji ve görme bozukluğunu içerir (23). DM etiyolojisine bağlı olarak, insülin sekresyonunda azalma, plazma glukoz kullanımında azalma ve glukoz sentezindeki artış hiperglisemiye etkileyebilir. Diyabete eşlik eden metabolik bozukluk pek çok organı ilgilendiren fizyopatolojik değişikliklere ve buna bağlı olarak, kişi ve toplum üzerinde ciddi bir sağlık yüküne neden olmaktadır (24).

3.5.1.Epidemiyoloji

Diabetes mellitus'un tanınması, erken dönemde tanı konması ve tedavi programlarının belirlenmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir (21). Diyabet epidemiyolojisi, ilk olarak 1979'da "National Diabetes Data Group" toplantısında ele alınmıştır.

Daha sonra 1980’de, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), DM kriterleri ve sınıflandırmasının belirlenmesi için yapılan toplantılarda diyabet epidemiyolojisi tartışılmıştır. Son 20 yılda diyabetin araştırma, bakım ve önlenmesi için epidemiyoloji çalışmaları oldukça hızlanmıştır. Günümüzde DM birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede epidemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Günümüzde epidemiyolojiye genetik, çevresel, davranışsal, sosyoekonomik ve kültürel faktörler etkilidir. Bu faktörlerin eklenmesi özellikle Tip 2 diyabet prevalansında artışa neden olmaktadır.

Dünyanın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülen DM’nin en yüksek prevalansı Amerika’da yaşayan Pima Kızılderilileri’nde olup % 55’tir. Grönland ve Alaska Eskimolarında ise DM prevalansının çok düşük olduğu saptanmıştır (23). 20 yaş ve üzerinde, % 45’i erkek ve % 55’i kadın; toplam 24.788 hasta ile yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması (TURDEP)’ e göre; DM prevalansı % 7,2 (daha önce tanı almamış yeni DM % 2,3) ve glukoz tolerans bozukluğu (IGT) prevalansı % 6,7 olarak tespit edilmiştir. Özellikle kırsal kesimde DM, IGT ve obezitenin sıklığı daha yüksek olarak saptanmıştır (25). Gökçel ve arkadaşlarının Adana’da yaptığı, bir çalışmada 20-79 yaş arasında rast gele seçilen 1637 erişkin bireyde diyabet görülme sıklığı kadınlarda %10.9 ve erkeklerde %12.9 iken toplam görülme sıklığı %11.6 olarak tespit edilmiştir (26).

3.5.2. Diabetes Mellitus’un Tanı ve Sınıflaması

Diabetes mellitus tanısı konusunda oldukça sık değişiklikler olmuştur. Amerikan Diyabet Birliği (ADA) ve WHO uzmanları tarafından paneller yapılmıştır. En son gözden geçirilen ve uzlaşma sağlanan tanı kriterleri

açıklanmıştır (19). ADA'nın 2004 ve WHO'nün 1999 yılı raporlarına göre DM'nin tanı kriterleri Tablo 1'deki gibidir (23,26,27).

Tablo 1. DM'nin tanı kriterleri.

ADA tarafından 2004 yılında kabul edilen DM'nin etiyolojik sınıflandırılması Tablo 2'deki gibidir (28).

1.Klasik diyabet belirtileri (poliüri, polidipsi, polifaji) ile beraber günün herhangi bir zamanında, plazma glokoz toleransının 200 mg/dl (11,1 mmol/L)' den fazla veya eşit olması
2.Plazma glukoz seviyesinin, en az 8 saatlik açlık sonrasında, 126 mg/dl (7,0 mmol/L)' den büyük veya eşit olması
3.75 gr glukoz kullanılarak uygulanan Oral Glukoz Tolerans Testin(OGTT)' den 2 saat sonra glukoz seviyesinin 200 mg/dl (11.1 mmol/L)'den büyük veya eşit olması

3.5.2.1 DM'nin Etiyolojik Sınıflandırılması

I- Tip 1 Diyabet

a) İmmünolojik

b) İdiyopatik

II- Tip 2 Diyabet

III- Diğer Spesifik Tipler

IV- Gestasyonel Diyabet(GDM)

3.5.2.1.1. Diğer Spesifik Tipler

- a) Hücre fonksiyonunun genetik bozuklukları
- b) İnsülin salgısıyla ilgili genetik bozukluklar
- c) Kistik fibrozis gibi ekzokrin pankreas hastalıkları
- d) Akromegali, cushing sendromu, feokromasitoma gibi endokrinopatiler
- e) İnsülin salgılanmasını etkileyen ilaç ve kimyasal maddeler
- f) Enfeksiyonlar
- g) Down sendromu gibi otoimmüniteye bağlı diyabet formları (26).

3.5.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabet, akut ve kronik komplikasyonlarla seyrederek. Uzun süreli diyabet kapilleri, arteriollerini yapan vasküler hücreleri ve bazal membranları etkileyerek tüm damarların yapısını bozar. Tüm mikrovasküler yapılar etkilenmesine karşın klinikte retina, renal glomerül ve büyük sinirlerdeki patolojiler ile ortaya çıkar (29). DM'nin akut ve kronik komplikasyonları gruplar halinde Tablo 2'de gösterilmiştir (30,31).

Tablo 2. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları.

Akut Komplikasyonlar
1. Diyabetik ketoasidoz (DKA)
2. Hiperosmolar hiperglisemik sendrom (HHS)
3. Laktik asidoz
4. Hipoglisemi

Kronik Komplikasyonlar

Makrovasküler komplikasyonlar

- a. Diyabetik kalp hastalığı
- b. Periferik arter hastalığı
- c. Serebrovasküler hastalık

Mikrovasküler komplikasyonlar

- a. Diyabetik nöropati
- b. Diyabetik nefropati
- c. Diyabetik retinopati

Diğer komplikasyonlar

- a. Diyabetik ayak
- b. Diyabetik gastroenteropati
- c. Genitoüriner bozukluklar
- d. Eretil disfonksiyon

3.6. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; atomik veya moleküler yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş “elektron” bulunduran molekül, atom veya iyonlardır. Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (32). Elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler (33). Serbest radikal üretimi çoğu olayda, patolojik mekanizmanın bir parçasıdır ve çoğu ksenobiyotiğin toksisitesi, serbest radikallerin üretimiyle ilgilidir (34).

Radikaller aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, patolojik durumlarında veya metabolizma sırasında birer yan ürün olarak oluşabilir ve hücrelerde tersinir ya da tersinmez reaksiyonlar ile değişikliklere yol açabilirler. Bu değişiklikler oksidasyon, fragmantasyon, köprüleşme (disülfit bağlantısı, protein-protein bağlantısı, protein-lipid bağlantısı), protein sarmalında kesilme, floresans şeklinde gerçekleşir. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve/veya organ hasarı oluşabilir.

Serbest radikaller; proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve DNA üzerinde hasar yapma kapasitesine sahiptirler. Bundan dolayı, hücre içi savunma mekanizmalarını inaktive edebilir ve yoğun konsantrasyona ulaştıklarında hücre içi bileşenlerle reaksiyona girerek metabolik ve hücresel bozukluklara sebebiyet verebilirler (35). İçinde olduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaydan kaynaklanan sürekli bir radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar esnasında farklı tür ve miktarda radikaller meydana gelmektedir. Radikaller genel olarak 3 ana mekanizmayla oluşurlar (32).

1) Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Yüksek enerjiye sahip elektromanyetik dalgalar veya yüksek sıcaklık (500-600 oC) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma arasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma adı verilir (31).

2) Normal Bir Molekölün Elektron Kaybetmesi: Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı esnasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek

elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon radikalleri indirgerken, kendisinin radikali meydana gelir (32).

3) Normal Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal yapıya sahip olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde ortaklaşmamış elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur (32).

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri aşağıda verilmiştir (37).

Oksijen merkezli serbest radikaller:

- Süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$)
- Hidroksil radikali ($\cdot OH$)
- Alkoksil radikali ($RO\cdot$)
- Peroksil radikali ($RO_2\cdot$)
- Hidroperoksil radikali ($HO_2\cdot$)

Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller:

- Karbon merkezli (Lipid radikalleri)
- Alkoksi radikalleri
- Sülfür merkezli (Sülfür radikali)
- Hidrojen merkezli (Hidrojen radikali)
- Demir merkezli (Perferil radikali)
- Azot merkezli (Nitrik oksid ,Nitrojen dioksid)

Radikal olmayan reaktif oksijen türleri:

- Ozon (O_3)

- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Hipoklorik asid ($HOCl$)
- Singlet oksijen (1O_2)
- Peroksinitrit ($ONOO$)

Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemli ve en büyük kısmını O_2 kaynaklı radikaller oluşturur (38). O_2 'in toksik etkisi olmamasına rağmen, aerobik hücre metabolizması esnasında serbest oksijen radikallerine (ROS) dönüşür (39).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlerden oluşurlar. Endojen kaynakları mitokondri, endoplazmik retikulum, fagositler, hücre membranları, enzim reaksiyonları ve otooksidasyon reaksiyonları oluşturur. Eksojen kaynaklar ise toksik kimyasallar, radyasyon, antiseptik ajanlar, anestezi maddeleri, çevresel faktörler, böcek ilaçları, tütün gibi çeşitli etmenlerdir (40,41).

3.7. Oksidatif Stres

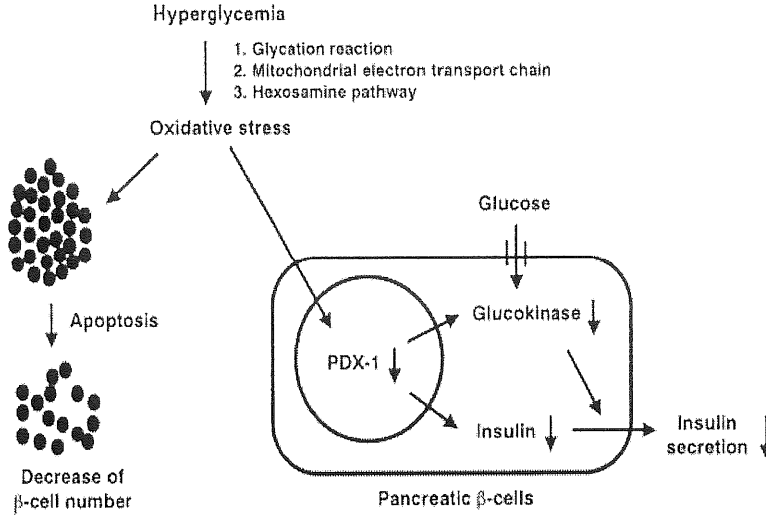
Oksidatif stres, hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin üretimi ve vücudun antioksidan mekanizmalar aracılığıyla kendini savunması arasındaki orantının bozulması olarak tanımlanabilir. (42). Dengenin bu şekilde bozulması çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında, kanser oluşumunda, diabette, iskemi/reperfüzyon travmalarında, inflamatuvar rahatsızlıklarda, nöro-dejeneratif hastalıklarda ve yaşlanmanın etyopatogenezinde rol oynamaktadır (43). Diabetes Mellitus, günümüz koşulları nedeniyle dünyada gittikçe yayılan, yüksek morbidite ve mortaliteye sebebiyet veren bir hastalıktır. Oksidatif stresin diyabetin etiyolojisinde rol aldığı ve diyabetin ilerlemesine neden olduğu, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabeti bulunan

olgularda serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun arttığı belirlenmiştir (44).

3.8.Diabetes Mellitus Oksidatif Stres ve Gelişen Komplikasyonlar

Diyabet ve diyabete bağlı oluşan komplikasyonların reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini açıklayan çalışmalarda; enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizması değişiklikleri sonucunda ortaya çıkan metabolik stres, sorbitol yol aktivasyonu, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucunda gerçekleşen doku hasarlarının serbest radikal oluşumunu artırdığı ileri sürülmektedir (45). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında bağlantı olduğu görüşü yapılan in vivo çalışmalar ile de gösterilmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer DM oluşturmak amacıyla kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin (STZ) oksidan maddeler oluşturarak langerhans adacıklarını seçici olarak hasara uğratmakta ve böylece diyabeti başlattığı düşünülmektedir (46,47). Araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, hem Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)'nin oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir.

Diyabetik olgularda, lipidlere ilave olarak protein oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kollajen, elastin ve miyelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonlar gelişmektedir (48).



Şekil 8. Diyabette glukoz toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin beta hücrelerindeki moleküler mekanizması (49).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla karşılaştırıldığında en düşük seviyede olduğu bilinmektedir. Pankreas adacık hücrelerinde yüksek glukozun konsantrasyonu hücrel strese sebebiyet verirken, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yeteri kadar yüksek olmaması oksidatif strese en duyarlı dokular arasına beta hücrelerini de dahil etmektedir (48, 50)

3.9.Diyabet ve Testis

Sanayisi gelişmiş toplumlarda artan tip I ve tip II diyabete bağlı olarak erkeklerde infertilite oranlarının arttığı bildirilmiştir (51). Diyabet penil ereksiyon ve ejakülasyonu etkilemekte olup spermatogenez üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiş olup diyabette bağlı olarak artan oksidatif stresin reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin aşırı üretimini

tetiklediği görülmüştür (52). Serbest radikaller bağışıklık sistemi hücreleri (nötrofil, makrofaj vs) için gerekli olsada aşırı üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır (48). Diyabetin patogeneğinde ve yan etkilerinde doku hasarı önemli bir faktördür (53). Bu nedenle diyabet ile birlikte testislerde apoptozis artmakta ve buda testislerde fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır (54). Diyabetin testosteron seviyesinde meydana getirdiği azalmanın yanı sıra testiküler disfonksiyon ve spermatogenez üzerindeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiş olup diyabetin, üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri bildirilmiştir. Testislerde, tunika albugineada, seminifer tubüllerde, interstisyel bağ dokusunda ve Leydig hücrelerinde diyabete bağlı olarak meydana gelen histolojik değişiklikler bildirilmektedir (55).

Aynı zamanda STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabet modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise seminifer tübül üzerinde bulunan reseptörlerin (FSH, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I)) diyabete bağlı olarak olumsuz etkilenmeleri ile FSH sentezinin azaldığı testosteron seviyesinin düştüğü ve buna bağlı olarak leydig hücrelerinde LH düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (56). Adrojen ve spermlerin üretildiği testisler, antioksidan elamanlar vasıtasıyla korunuyor olmasına rağmen endojen ve eksojen kaynaklı faktörler oksidatif stres meydana getirmekte ve testisler üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır (57).

3.10. Antioksidanlar

3.10.1. Antioksidan Mekanizmalar

Serbest radikaller toksik özellikleri yüksek maddeler olduğu için organizmalar bunları etkisiz hale getirmek amacıyla bazı savunma sistemleri

geliştirmişlerdir. Bunlara kısaca antioksidanlar adı verilmektedir (58). Etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyon'unun başlamasını önleyerek yapabilmektedir. Ayrıca antioksidanlar geçiş metal iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir ve peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayabilmektedir. Antioksidanlar; intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki grupta incelenirler. Zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girmektedir.

En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (59). Farklı yapılardaki serbest radikaller için hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara ihtiyaç vardır. Hidrofilik antioksidanlar sitozol ve ekstraselüler sıvılarda, lipofilik özellikteki antioksidanlar ise membranlarda ve lipoproteinlerde bulunurlar (60).

Antioksidanları birçok faktöre göre sınıflandırmak mümkün olup 4 başlık altında toplanmaktadır bunlar;

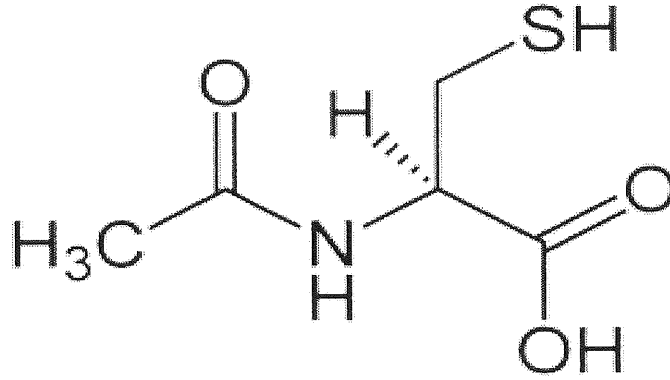
- Yapısal özelliklerine göre (enzimatik, enzimatik olmayan),
- Kaynaklarına göre (endojen, ekzojen),
- Çözünürlük özelliklerine göre (suda çözünenler, yağda çözünenler) ve
- İnsan vücudundaki yerleşimlerine (intraselüler, ekstraselüler) göre sınıflara ayrılır (61).

Tablo 3. Yapısal özelliklerine göre antioksidanların ve alt gruplarının gösterilmesi

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albumin
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	β -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

3.10.2. N-Asetilsistein (NAS)

N-Asetilsistein (NAS) beyaz kristal şeklinde olup toz halindedir. 104 ile 110°C’de erimeye başlar. Molekül ağırlığı 163.2 gr/mol olup molekül formülü $C_5H_9NO_3S$ ’dür.



Şekil 9. N-Asetilsistein Moleküler Formülü Şematik Gösterimi (62).

İntravenöz alımı takiben yarılanma ömrü 5.58 saattir. Majör atılım ürünü inorganik fosfat şeklindedir. 1960’lı yıllardan beri NAS mukolitik bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Genel olarak mukolitiklerin yapısında serbest sülfidril (tiol) grubu vardır. Mukolitik ilaçlar mukustaki disülfid bağlarını kırarak mukoproteinleri parçalar ve mukusun viskozitesini azaltırlar. Zamanla bu mukolitik ilaçların hücre içerisinde sistein miktarını artırdığı görülmüş olup, hücre

içinde artan sisteine bağı olarak bir antioksidan olan glutatyonun sentezinin'de arttığı tespit edilmiştir (63).

Ayrıca akciğer hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, metal toksisitesi, karaciğerin parasetamol toksisitesi, Römatooid artrit, siklofosfamide bağı oluşan hemorojik sistit etkilidir (64). NAS hücre içindeki proteinlerin aktivitelirinin düzenlenmesine yardımcı olduğundan apoptozun oluşumunu engellediği bilmektedir. NAS endotel disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erezyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon olaylarında önemli rol oynamaktadır (65). Nörolojik hastalıklardaki rolü henüz kesin olarak aydınlatılamamış olsada akciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak NAS 'a başvurulmaktadır (66).

NAS Düşük moleküler ağırlıklı bir bileşik olan, glutatyon prekürsörüdür. Glutatyon stoklarını yeniden doldurmakta, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırmakta, hidroksil radikallerini azaltmakta ve otokatalitik lipid peroksidasyonunu engellemektedir (67). Ayrıca hücre koruyucu ve antioksidan özellikleri de vardır. Antioksidan özelliğini, GSH seviyelerini düzenleyerek, doğrudan radikalleri temizleyerek, nötrofil aktivitesi ve Tumor nekroz faktör (TNF) üretimini baskılayarak gerçekleştirmektedir (68). NAS ve GSH sigara dumanı ve diğer zararlı maddelerin solunmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini bağlamakta olup, aynı zamanda akciğer enfeksiyonlarında nötrofillerin oluşturduğu serbest radikalleri bağlayarak hücrelerde koruyucu etki sağlaması hücre hasarının önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. NAS 'in deneysel sepsis modelinde DNA'nın oksidatif strese etkilenerek hasar görmesi

sonucu oluşan malondialdehid (MDA) düzeylerinde anlamlı bir azalma meydana getirdiği de görülmüştür (69).

NAS farklı hücre tiplerinde G1/S faz geçişlerini bloke ettiği tespit edilsede NAS'ın henüz hücre siklusundaki işlevi tam olarak açıklanamamıştır. Hücresel düzeyde Yapılan başka bir çalışmada NAS'ın protein kinaz aktivasyonunu inhibe ettiği ifade edilmiştir (70). NAS'ın antimutajenik ve antikarsinojenik özellikleri; antioksidan aktivitesi, intraselüler redükte edilmiş GSH prekürsörü gibi davranma özelliği, detoksifikasyon modülasyonu, DNA rejenerasyonu gibi mekanizmayla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (71).

3.11. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel  zellikleri

Hücrenin etrafını sarak, onu içinde bulunduğu ortamdan ayıran ve ona şekil kazandıran seçici geçirgenlik özelliği gösteren yapı 'hücre zarı' olarak tanımlanmaktadır. Hücre zarı enzim ve organeller sayesinde canlılıklarını devam ettirmekte olup elastik, ince ve kıvrılabilir bir yapıdadır. 7.5-10 nanometre kalınlığında olup lipit ve proteinlerden oluşmuştur. Hücre zarının bişenleri yaklaşık olarak % 55 protein, % 25 fosfolipit ,%13 kolesterol , %4 diğer lipitler ve %3 karbonhidrattır (19).

3.12. Hücre Zarı Kanalları

Hücre içi sıvı ile hücreler arası sıvı arasında madde geçişlerini sağlayan protein tabiatındaki yapılara hücre zarı kanalları adı verilmektedir. Bu protein yapılar mebranda çeşitli moleküller için alternatif geçiş noktaları oluşturmasından

dolayı hücre zarının sürekliliğini bozmaktadır. Hücre zarı kanalları taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (19).

A)-Taşıyıcı proteinler: Hücre zarı kanallarının büyük bir bölümünü taşıyıcı proteinler oluşturmaktadır. Taşınması gerçekleştirilecek olan molekül, protein yapıyla etkileşiminden sonra oluşan şekil değişikliği veya boşluk maddelerin transportunu gerçekleştirmektedir

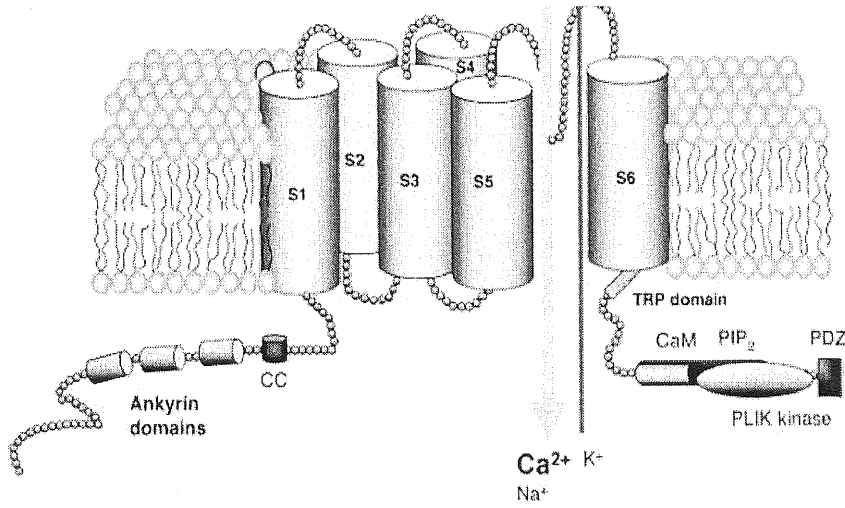
B)- Kanal Proteinleri: Daha çok iyon moleküllerinin taşınmasında uygun olan kanal proteinlerinden bazıları su moleküllerinin geçişleri için spesifik kanallar ihtiva etmektedirler. Molekül ve iyonların türüne göre kanal proteinleri veya taşıyıcı proteinler seçicilik göstermektedirler (72). Kanal proteinlerinin aktivasyonuna neden olan mekanizmalara göre (Ligand Duyarlı, Voltaja duyarlı gibi) ve geçişen oldukları iyon moleküllerine göre (Kalsiyum kanalı, Potasyum kanalı gibi) sınıflandırılması yapılmaktadır (73).

3.12.1 Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalı ve Ailesi

TRP proteini ilk kez uzun süreli aydınlatmaya maruz bırakılan ve dolayısıyla görme bozukluğunun olduğu *Drosophila melanogaster*'ın mutan suşunda keşfedilmiştir (74). Transient Reseptör Potansiyel (TRP) proteinleri katyon kanallarının büyük bir süper ailesini temsil eder. TRP kanalları, Sodyum (Na^+), Kalsiyum(Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2})'ya geçirgen, seçici olmayan katyon kanallarıdır (75). TRP kanalının aile üyelerinin sayısı insanda 27, Farede 28, *Caenorhabditis elegans*'da 17 ve *Drosophila melanogaster* 13 olmak üzere türlere göre değişimi görülmektedir. TRP katyon kanalları yakın zamanda

sınıflandırılmış olup diğer iyon kanallarına göre aktivasyon mekanizmaları ve seçiciliği daha fazladır (76).

TRP proteinleri tipik bağlanmaların meydana gelmesiye homotetromer veya heterotetromer formların oluştuğu fonksiyonel kanallardır (77). Voltaj kapılı potasyum kanalları ile TRP kanalları birbirine benzemekte olup basit yapılarıdır. Kanal açıklığının 5. ve 6. segmentleri arasında bir iletken iyon çevresinde homotetromik veya heterotetromik düzenlenmeler gerçekleştirirler (78).



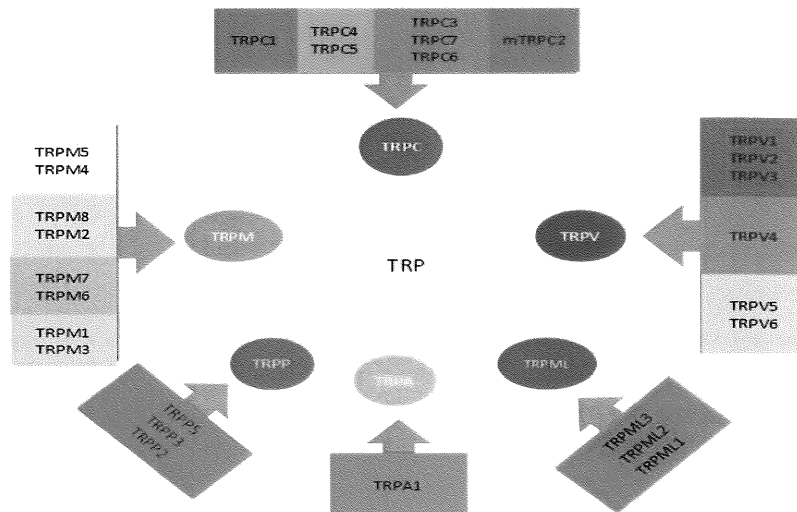
Şekil 10. TRP Reseptör alt-biriminin moleküler modeli (79).

TRP kanalları muhtemelen az bir sekans benzerliği olan Na⁺ ve Ca²⁺ konsatrasyonları ile voltaj kanallarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilmektedir (80). TRP kanallarının topolojisi voltaj kapılı kanallara benzer. Ancak pozitif yüklü aminoasitlerin voltaj algılamasında TRP üyelerini etkilememesi TRP kanallarının non voltaj kanalları olarak hareket etmesine neden olur (81). Kanal fonksiyonunda N- ve C- terminalleri hücre içinde olmak üzere düzenleyici proteinler ile ilişkili olup muhtemelen kanal fonksiyonu tetramerler ile olmaktadır (82). TRP kanallarının aktivasyon mekanizması çeşitli olup reseptör aktivasyonunda diaçilgliseroller (DAG) fosfoinositler (İP) G- protein aracılı

fosfolipaz-c (PLC) ürünleri TRP kanallarının aktivasyon mekanizmasına örnek olarak verilebilir. Ayrıca adenosin difosforiboz (ADP-Riboz) Beta-Nikotinamin adenin dinükeotid (β -NAD) ve Adenosin Trifosfat (ATP) 'ın yanı sıra Ca^{+2} ve Mg^{+1} gibi inorganik maddeler ile endojen proteinler etkili olabilmektedir (80).

Doğal, sentetik ve ligantlı bileşikler, kapsain, menthol gibi küçük eksojen moleküllerin TRP kanallarının aktivasyonunu etkileyen mekanizmalarla ilişkili oldukları bildirilmiştir (83). Ayrıca TRP kanalları tat, dokunma, koku duyusu ve işitme dahil olmak üzere birçok mekanizmada etkili olup sıcaklık ve stres, kanalın mekanizmasını etkilemektedir (84). TRP kanallarının yapısındaki proteinlerin aminoasit dizilimlerine göre 29 üyeye, homolog olmasına göre ise 7 alt aileye sınıflandırılmıştır. TRPC (Transient Reseptör Potansiyel kanonik), TRPV (Transient Reseptör Potansiyel vanilloid), TRPM (Transient Reseptör Potansiyel melastatin), TRPA (Transient Reseptör Potansiyel ankirin), TRPP (Transient Reseptör Potansiyel polisistin), TRPML (Transient Reseptör Potansiyel mucolipin) ve TRPN veya diğer adıyla NOMPC (Non mekano reseptör potansiyel-c) olarak bilinmektedir.

TRPC 7 alt aileden, TRPV 6 alt aileden, TRPM 8 alt aileden, TRPP,3 alt aileden, TRPML 3 alt aileden ve TRPA 1 alt aileden ve TRPN 6 alt aileden oluşmaktadır (78).



Şekil 11. TRP ailesi şematik gösterimi (85).

TRPN hariç diğer tüm alt aileler memelilerde bulunabilmektedir. Altı tane transmebran proteini ile karakterize edilen TRP kanallarının 5 ve 6 segmentler arasında oluşan porlarla olur (75).

3.12.2. Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM)

Memelilerde TRPM alt ailesinin ilk olarak isimlendirilmesi tümör baskılayıcı proteinlerde bulunmasıyla başlamış olup 4 homolog çiftler halinde aralarında ayrılmışlardır. Transient Receptor Potential Melastatin1 / Transient Receptor Potential Melastatin3 (TRPM1/TRPM3), Transient Receptor Potential Melastatin2 / Transient Receptor Potential Melastatin8 (TRPM2/TRPM8), Transient Receptor Potential Melastatin4 / Transient Receptor Potential Melastatin5 (TRPM4/TRPM5) ve Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM6/TRPM7) (86). TRPM kanalları TRP ailesinin diğer üyelerine göre sınırlı bir homoloji benzer aminoasit dizilimi gösterir. TRPM ailesinin tüm üyelerinde N-terminal bölgesi transmebran bölgesi ve C- terminalinden oluşmakta olup tüm TRPM alt üyelerinde N-terminal bölgesi aynı karakteristik özellik göstermektedir (87).

TRPM1 kanalı hariç diğer TRPM katyon kanallarının mekanizması ve aktivasyonu tam olarak aydınlatılamamış olsada ADPR pirofosfataz ile aktive olabilen ve fonksiyonel NUDT9-H (TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge) homoloji alanı içeren TRPM2 Ca^{+2} iyonuna çok geçirgendir. Fakat TRPM4 /TRPM5 TRPM6 /TRPM7 Ca^{+2} iyonuna geçirgenlikleri farklı olup TRPM4- TRPM5 hem ısıya hemde Ca^{+2} iyonuna duyarlıdır (88).

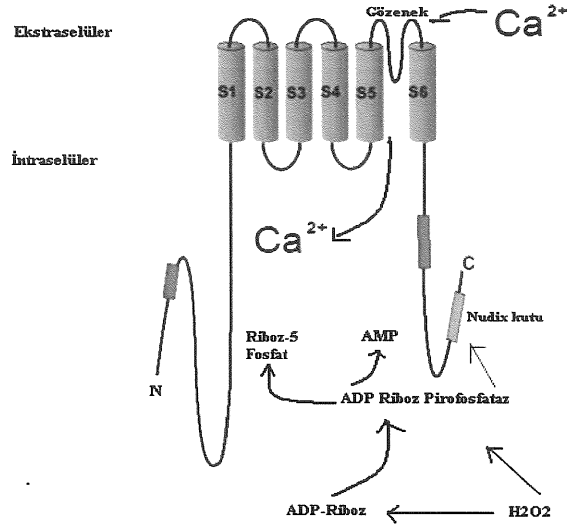
Yarı yarıya benzer homolojik yapı özelliğini gösteren TRPM4 ve TRPM5 daha çok kalpte bağırsaklarda ve damar endotelinde yoğun olarak tespit edilmiştir (89).

3.12.2.1 Transient Receptor Potential Melastatin2 (TRPM2)

TRPM2 Ca^{+2} iyonuna geçirgen seçici olmayan çok fonksiyonlu katyon kanalıdır. Daha önceden LTRC2 veya TRPC7 olarak bilinmektedir. İnsanda TRPM2 kanalının kromozomdaki gen lokasyonu 21g.22.3. olup 90 kilo baz çiftleri (KB) ve 32 eksondan oluşmaktadır.

İnsan TRPM2 kanal proteinin bileşiminde 1503 tane rat ve farelerde ise 1507 tane aminoasit bulunmakta olup moleküler kütle ağırlığı yaklaşık 170 k Da dur. TRPM2 6 tane transmebran segmenti (S1-S6) içerir. Hücre içinde N-ve C-terminal uçları ile 5. ve 6. segmentler arasında bulunan açıklıkla iyon geçişleri olmaktadır. Kanalin N ve C olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. C ucuna nudix domain denilmektedir. Bu uça ADPR pirofosfataz enzimi bulunmakta olup. Bu enzim, ADPR (İntrasellüler adenine 5'-diphosphoribose)'dan AMP (Adenozin monofasfat) ve Ribose 5-fosfat oluşumunu katalizlemektedir. N- terminalinde calmodulini (CAM) bağlamak için yaklaşık 700 aminoasit vardır (90).

C- terminal bölgesinde ise homotetromerik yapıdaki NUDT9 homoloji alanı olduğu bildirilmiştir. C ve N uçları dahil olmak üzere bu uçlar arasında kalan transmebran alan TRPM2 kanalını 3 ana bölgeden oluşturmaktadır. TRPM2 kanallarının C ucunda bulunan Nudix bölgesi kanalın açılıp kapanma aktivitelerinde çok önemli rol oynamaktadır (91).



Şekil 12. TRPM2 Kanalının moleküler yapısı (92).

ADPR pirofosfataz hem, ADPR'dan AMP ve Ribose 5-fosfat oluşumunu katalizlemektedir. Hem de NUDIX bölgesinde bulunan NUDT9-H aktivasyonunu etkilemekte olup kanal hareketinde önemli bir etken olduğu bildirilmiştir (93). Oksidatif stres, hidrojen peroksit ya da tümör nekrozis faktör α (TNF α) TRPM2 kanallarında Ca^{+2} akışını uyardığı birçok çalışmada rapor edilmiştir. TRPM2'nin farklı aktivasyon özelliklerine sahip üç fizyolojik varyantı tespit edilmiştir; bunlar TRPM2-S, TRPM2- Δ N, TRPM2- Δ C TRPM2, TRP kanallarının çoğunda olduğu gibi Ca^{+2} affinitesi son derece yüksektir. TRPM2 calmodulin ile veya doğrudan Ca^{+2} iyonunun bağlanması ADPR ile TRPM2 arasındaki kombinasyonu güçlü bir şekilde düzenlemektedir (94). Birden fazla faktörün kanal etkinliğini düzenlediği bilinmektedir. Kanalın etki aktivitesini nükleotid sentez yollarındaki çok sayıda küçük sinyal molekülleri etkilemekte olup O-Asetil-ADPR (OAADPR) nikotinik asit adenindinükleotid (NAADP), β -nikodinamin adenin dinükleotid (β -NAD), Siklik ADPR (cADPR), poli-ADPR, Ca^{+2} iyonu için güçlü antagonistler olarak bilinmektedir (95).

Yapılan çalışmalarda bazı non-spesifik farmakolojik ajanlar TRPM2 kanal aktivasyonunu bloke ettikleri bildirilmiştir. Örnek olarak anti fungal ajanlar, flufenomik asit (FFA) gibi fenometler başta olmak üzere klotrimazol ve ekonazol, antranilik asit, bunlardan bazıları olup non-steroid anti inflamatuvar ajanlar merkezi sinir sisteminde geniş spektrumda iyon akışını inhibe edebilmektedir. FFA TRPM2 aktivasyon bölgesine bağlanması kısa sürelide olsa irreverzibil bir reaksiyon oluşturmakta ve kanalı inhibe etmektedir (96).

ADPR veya türevleri TRPM2 metabolize bölgesinin aktivasyonuna yol açtıklarından dolayı TRPM2 hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır. Çünkü apoptozda etkili olan kaspazın aktivitesi için kalsiyum sinyalini gerekmektedir (97). Birçok hücre içi ve dışı moleküller nöronal doku hasarına ve apoptozuna katılabilirken, oksidatif stres ürünlerinin birikimi, ROS' un aşırı üretimi, hücre hasarı ve ölümü için potansiyel bir faktör olarak görünmektedir (98). TRPM2 oksidatif stres tarafından aktive edilebildiği için, son zamanlarda, şeker hastalığı, inflamasyon, miyokardiyal enfarktüs ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı potansiyel bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmıştır (99). Hidrojen peroksit TRPM2 aktivasyonuna neden olması hücre içinde Ca^{+2} iyonu artışına sebep olur. Hidrojen peroksit ile indüklenen ve dolayısıyla TRPM2 kanalı üzerinde oluşan oksidatif strese bağlı olarak ADPR oluşumunu tetiklediği görülmüştür(100). Glikoz ile uyarılan β - pankreatik hücrelerinde insülin salınımına bağlı olarak depolarize olan hücrelerde Ca^{+2} iyonu girişlerinde TRPM2 'nın anahtar rolü olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (101).

3.12.2.1.1. TRPM2 Kanal Aktivasyonunda Diyabet ve Oksidatif

Stresin Rolü

TRPM2 kanalı oksidatif stres tarafından aktive edilebildiği için, son zamanlarda, diyabet, inflamasyon, miyokardiyal enfarktüs ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı potansiyel bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmıştır (99). TRPM2 kanalları β - pankreatik hücrelerinde oldukça yoğun miktarda olduğu ifade edilmiştir (102). Glikoz ile uyarılan β - pankreatik hücrelerinde insülin salınımına bağlı olarak depolarize olan hücrelerde Ca^{+2} iyonu girişlerinde TRPM2 'nın anahtar rolü olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (101). Bundan dolayı beta hücre disfonksiyonunun ilerlemesine oksidatif stresin neden olduğu ileri sürülmektedir (103).

3.13. Apoptozis

Hücrenin kendisini öldürmesi olarak bilinen apoptozis diğer hücrelere zarar vermeden genetik kontrol altında dejenere olan hücrelerde veya biyolojik ömrü dolmuş hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik değişimlere bağlı olarak gerçekleşen hücre ölüm olayıdır. Ancak fizyolojik olarak hücrelerin ölümleri biliniyor olmasına rağmen ilk kez 1972 yılında Kerry ve arkadaşları ölen hücrelerde meydana gelen karakteristik değişimleri belirleyip bu olaya Apoptozis adını vermişlerdir (104). Hücrenin kendisini yok etmesi olarak tanımlanan apoptoz canlı sistemde homeostazının korunması için gerekli bir olaydır. Bu olay genetik meteryaller ile düzenlenen programlı protein sentezine ve dolayısıyla enerjiye ile gerçekleşen reaksiyonlar zinciridir.

Basit yapıda ve tek hücreli *Caenorhabditis elegans* nematodu ile yapılan apoptozis çalışmalarında Sydney Brenner ve arkadaşları “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusuyla 2002 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır. Bu nematodlarda 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 apoptozu kontrol mekanizmasını oluşturmaktadır. Ced-3 ve ced-4 genlerini mutasyonla inaktive edilmiş nematodlarda apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi gereken hücreler yaşamaya devam ettiği görülmüştür.

Bu nedenle ced-3 ve ced-4’ün ölüm genleri olup apoptozu indükledikleri, ced-9’un ise ölüme karşı koruyan gen olup apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bugün bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apoptotik Proteaz Aktive Faktor 1 (Apaf-1) ve ced-9 için Bcl-2 olduğu ifade edilmiştir (105). Hem prokaryot hemde ökaryot canlılarda yaşamın devamı için yeni hücreler oluşurken, varolan fizyolojik, olarak programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ve patolojik hücre ölümü nekroz gibi çeşitli hücre ölümleriye var olan yaşam dengesi kontrol altına alınmaktadır (106).

Bir hücrede meydana gelen kimyasal ve fiziksel hasarlar hücrede ölüme sebebiyet vermesi olayı nekroz olarak tanımlanır ve patolojiktir (106). Nekroz bir grup hücrede veya dokunun bir bölümünde görülürken Apoptozis tek bir hücrede gerçekleşir. Apoptozis ve nekroz birbirinden tamamen bağımsız iki kavram olup Nekrozda hücre mebranının yapısı bozularak hücre deplazmoliz olur ve lizise uğrar. Apoptoziste ise hücre ölümleri DNA’nın yapısında meydana gelen dejenerasyonlar sonucu gerçekleşir (108,109). Hücrelerin genetik kodlarında var olan apoptozis çeşitli sinyal molekülleriyle patofizyolojik olaylarla ve oksidatif stresle aktive olabilmektedir.

Ancak apoptozisle ilgili mekanizma günümüzde halen tam olarak bilinmemektedir (110). Hücre içi elektron dengesinin bozulması, Oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptoz oluşumunu tetikleyebilmektedir (111). Ayrıca apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak: büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (112). Apoptik cisimler Apoptozda çok önemli role oynamaktadırlar. Apoptoz giden hücrelerin kromatin ve sitoplazma yoğunlaşmasının akabinde hücreler küçülür ve zamanla küçük cisimcikler meydana gelir. Bu yapılar apoptik cisimcikler olup üzerlerinde oluşan yeni reseptörler çevre hücreleri uyarak fagositozunu gerçekleştirirler (113,114). Fagositozları esnasında inflamatuvar ajanlar salgılamayan apoptik cisimler dağınık obekler halindedir (115). Apoptik cisimlerin bazılarında bazofilik nükleer materyal varken bazılarında yoktur. Kromatin kümeleri hilal şeklindedir. Sitoplazmaları oval ve kitleler halindedir. histolojik anlamda bu özellikleri apoptik cisimlerin için karakteristiktir (116).

3.13.1. Apoptozun Testisler Üzerindeki Etkisi

Apoptozis defektif hücrelerin elimine edilmesinde rol oynamakta olup germ hücreleri ve sperm hücrelerinin normal fizyolojide gelişmeleri için gereklidir. Testislerde apoptozisi patofizyolojik dış etmenler ve testise bağlı hastalıklar artırmaktadır (117,118). Hücre içi elektron dengesinin bozulması, oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptoz oluşumunu tetikleyebilmektedir(111).

Testiste, defektif germ hücrelerinin toplam germ hücresine oranı yaklaşık %75 olup bu dejenere hücreler apoptoz mekanizmasıyla ortamdan uzaklaştırılırlar (119). Bundan dolayı testiste sürekli olarak apoptozis gerçekleştiği Kerry tarafından yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (120). Dokuların normal fizyolojik yaşamını devam ettirebilmeleri için apoptozis mekanizması diğer dokularda olduğu gibi testislerde de çok önemlidir. Bcl- 2 ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi faktörler apoptoz mekanizmasında yer alırlar. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşması olup (121). Spermatozaların fizyolojik gelişimi için Germ hücrelerinde meydana gelen apoptozis çok önemli bir rol oynamaktadır. Hormonal yetersizlik, kriptorşidizm, testiste artan kan akış hızı, testiste lokal ısı artışı, venöz staz ve buna bağlı hipoksi, azoospermi testiküler hipotermi olgularının tümü testiste apoptozu artıran faktörlerdir (122). Seminifer tübül epitelinde meydana genel çevresel faktörlerin etkisiyle (ısı, radyasyon veya soğutma gibi) germ hücrelerinde apoptozisi artırabilir (117).

3.13.2. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tespit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tespit edilebilmektedir. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir (123).

Tablo 4. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

1.Morfolojik görüntüleme yöntemleri	
❖	Hematoksilen Boyama
❖	Giemsa Boyama
2.İmmünohistokimyasal yöntemler	
❖	Anneksin V Yöntemi
❖	TUNEL Yöntemi (TdT-mediated nick and labeling technique)
❖	M30 Yöntemi
❖	Kaspaz-3 Yöntemi
3.Biyokimyasal yöntemler	
❖	Agaroz Jel Elektroforezi
❖	Western Blotting
❖	Flow Sitometri
❖	Malondialdehit (MDA)Yöntemi
4.İmmunolojik yöntemler	
❖	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
❖	Fluorimetrik Yöntem
5.Moleküler biyoloji yöntemleri	
❖	Dna Microarray
❖	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması

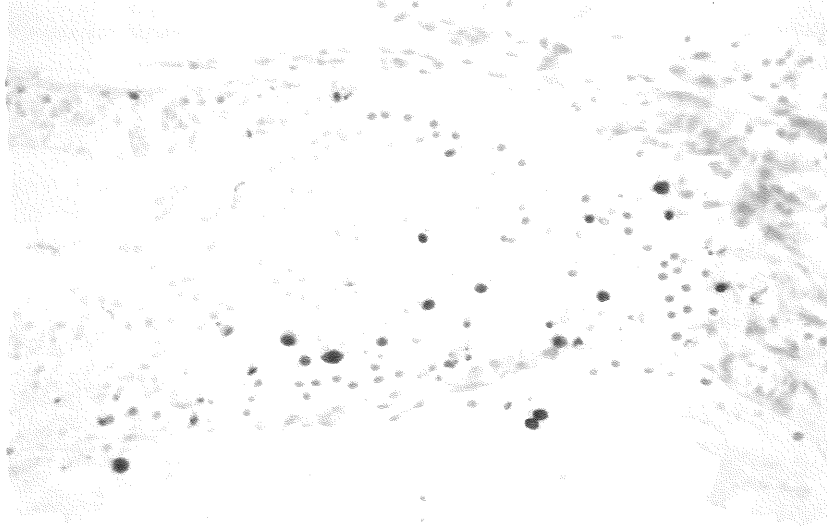
3.13.3. İmmünohistokimyasal Yöntem

3.13.3.1.TUNEL Yöntemi (TdT-mediated nick and labeling technique)

TUNEL , Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End

Labeling kelimelerinin kısaltmasıdır.

İlk kez 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından bulunan TUNEL yöntemi; apoptotik sinyal kaskadında, DNA kırıklarının saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır(124). TUNEL yöntemiyle spesifik DNA kırık uçları oluşmaktadır. Apoptotik hücrelerdeki. DNA'lar hızla parçalandıkları için kromatin ağın yapısı bozulur. ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı artar (124). Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına Terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi biotin-dUTP'yi ekler (125). DNA parçacıkları biotin ile işaretlendikten sonra ortama avidin eklendiğinde görünür hale gelmektedir. Ancak DNA'nın 3'OH kısmı biotin, digoxigenin ya da florescein gibi nükleotidler vasıtasıyla modifiye edilmiş enzimatik etiketler ile belirlenebilir (127).



Şekil 13. TUNEL metodu uygulanmış rat testis dokusunda kahverengi boyanmış apoptotik hücreler (128).

Temelde TUNEL metodu serbest 3'OH uçlarının işaretli ve işaretli olmayan nükleotidler kullanılarak apoptozis'in belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

TdT vasıtasıyla ortama eklenen nükleotitler DNA bağlanır ve nükleotit trifosfatazları aktive ederler daha sonra ortama eklenen digoksinin nükleotitlerle birleşerek 24 'lu oligomerik bir yapı oluştururlar ve peroksidaz özellik gösteren antidioksinin ile bağlanırlar. Bu reaksiyonlar sonucunda peroksidaz antikoru kromojenik substrat ile etkileşime girerek bağlanma meydana gelir ve sonuç olarak Apoptotik cisimlerde 3'OH uçlarının boyanması gerçekleşir (129).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 04.04.2013 tarih ve 44 Sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' nin TF.1327 proje no' lu kararı gereğince karşılandı.

4.1. Deney Hayvanları Ve Beslenmeleri

Deneylerde kullanılan 28 adet 8-10 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında bulundukları ortamın sıcaklığı 22–25 °C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00-07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı.

Yemler; elik kaplarda, su; cam biberonlarda normal eme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı. Yemlerin terkibi Tablo 5' de gösterildi.

Tablo 5. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca. ** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur

4.2.Deney Gruplarının Oluşturulması

Ağırlıkları 250-270 gr arasında değişen 8-10 haftalık 28 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol Grubu); Deney süresi olan 8 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (NAS grubu); 8 Haftalık deney süresi boyunca her gün 100mg/kg NAS intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Grup III (Diyabet Grubu); 50mg/kg olacak şekilde tek doz Streptozotosin (STZ) 0.1 M sodyum sitrat Tamponun'da (pH:4.5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kanda, kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi.

Grup IV (Diyabet + NAS grubu); 50mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0.1 M sodyum sitrat tampon (pH:4.5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı ve 72 saat sonra kuyruk venin'den alınan kanda, kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilip deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca her gün 100mg/kg NAS i.p olarak uygulandı.

4.3. Diyabet İndüksiyonu

Çalışmada kullanılacak 14 adet erkek sıçanları diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 50 mg/kg dozunda STZ (Sigma Chemical Co Louis Missouri) 0,1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4,5) çözündürülerek i.p enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. 72 saat sonra, 12 saat aç bırakılan sıçanlar sabah saat 9-10 arasında kuyruk venlerinden kan örneği alınarak, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu düzeyi 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

4.4. Doku Örneklerinin Alınması

Deneyin sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı. Testis dokusu MDA ve TRPM2 mRNA düzeyleri için çalışmanın sonuna kadar - 80 °C'de saklandı.

Histolojik çalışma için her gruptan alınan testis dokuları bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra sırasıyla % 50'lik, % 60'lık ve % 70'lik alkollerde yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 6) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde parlatılıp parafin bloklara (Sigma- paraplast embedding media, Stenheim, Germany) gömüldü.

Tablo 6. Histolojik takip serileri

1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1,5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1,5 saat
13	Sert parafin	3 saat
14	Gömme	

4.5. Malondialdehid (MDA) Çalışması

0.42 gr Tris-Base + 1.43 gr Tris-HCl + 3 gr KCl ve 0.5 ml Tween 20, 250 ml distile suda hazırlandı. Hazırlanan bu tampon örneklerin homojenatında kullanıldı. X gr doku üzerine 5 ml tampon ilave edildi ve parçalandı. Homojenat 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımdan 1 ml başka bir tüpe alındı. Alınan 1ml örnek üzerine 1ml %10 'luk Trikloretik Asit (TCA) (10 gr TCA 100 ml distile suda hazırlandı) ilave edildi. Üzerine 1ml %0.6 Tiyoobarbiturik Asit (TBA) (0.6 gr TBA 100 ml distile suda hazırlanır hazırlanan TBA +4 en fazla bir gün saklanabilir) ilave edildi. Üzerine 1ml distile su ilave edildikten sonra, son olarak 0.5 ml %4 HCl ilave edildi.(4ml HCl 100 ml distile suda hazırlanır, asit ve su şiddetli reaksiyona girdiği için mümkünse asit damlalar şeklinde suya ilave edilmelidir).

Hazırlanan karışım 90-95°C de 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığında soğutuldu ve üzerine 3 ml bütanol ilave edilip vortekslendi. Daha sonra tüpler 5 dk 5000 rpm de santrifüj edilir ve oluşan (bütanol faz) Süpernatanttaki kırmızı-pembe renk spektro küvetine pipet yardımıyla alınır ve bütanole karşı 532 nm de okundu. Okunan absorbans değeri x: (okunan_{ABS} +0.0344)/0.0492 formülüyle hesaplandı. Bulunan değer 5 ile çarpıldı (nedeni doku homojenatı 5ml tamponda hazırlandı) çıkan sonuç homojenatta kullanılan doku ağırlığı kadardır.

4.6. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lık proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi.

Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Skala bar: 50µm. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. TUNEL Boyama prosedürü.

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilin	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

4.7. İmmünohistokimyasal İnceleme

Testis dokusunda TRPM2 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. (Tablo 8). Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı.

Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra primer antikor (Rabbit Anti-TRPM2 antibody, ab101738, Abcam, Cambridge, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulanmasından sonra Streptavidin Alkaline Phosphatase (TS-060-AP, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara Fast Red Substrate System (TA-125-AF, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilin ile zıt boyaması yapılan dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı.

Pozitif kontrol için meme dokusu ile karşılaştırıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine PBS kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 9) ve istatistiksel analizler yapıldı.

Tablo 8. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin HRP (Horse radish peroksidaz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole)	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Tablo 9. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

4.8. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Metodu

Testis dokusunda RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti kullanıldı. Çalışma prosedürü aşağıdaki gibidir:

Kit içerisindeki lizis buffer'dan 1ml ve 2-merkaptoetanol'dan 10 µl falkon tüpüne alınıp karıştırılarak Lizis tampon çözeltisi elde edildi. Testis dokusu, ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltiden 600µl alınarak kilitli eppendorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 6 dakika (dk) 9. hızda parçalama işlemi yapıldı. Örnekler 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir eppendorfa alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarıldı ve 12.000xg'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kalan örneklerde kolonlara aktararak aynı şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı boşaltıldı. Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II ile yapıldı. Örneklerle 700 µl Wash I eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örneklerle 500 µl Wash II eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı.

Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar alınarak yeni ependorf tüplere bırakıldı ve üstüne 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Ependorf tüpün dibindeki sıvı kısım bu aşamadan sonra RNA içermektedir. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Spektrofotometrik RNA Ölçümü

Bu çalışmada RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. Komplementer DNA sentezi (cDNA) için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı.

Komplementer DNA Sentezi

Çalışmamızda cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. cDNA sentezi toplam 20µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 10. cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	Katalog No
10X RT Tamponu	2.0	4319981
25X dNTP karışımı (100mM)	0.8	4367381
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 11. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

PZR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25 ⁰ C	37 ⁰ C	85 ⁰ C	4 ⁰ C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu:

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edildi. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz(GAPDH) ve TRPM2 genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki tablolarda verilen primerler kullanıldı.

Tablo 12. RT-PZR’da kullanılan primerler

TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250µl	
Test	Katalog Numarası
Gapdh	Rn-01775763-g1
TRPM2	Rn-01429417-m1

Real Time PZR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PZR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5µl TaqMan Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate’deki cDNA örneklerinin üzerine 8µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate’in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 13. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim(µl)X Örnek Sayısı
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5
Toplam	10.0

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50⁰C'de 2 dakika, 95⁰C'de 10 dakika, 95⁰C'de 15 saniye ve 60⁰C'de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 14. Uygulanan RT-PZR programı

RT-PCR X 40 döngü				
	1. Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	50 ⁰ C	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C
Zaman	2dk	10dk	15sn	1dk

4.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı. $p<0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.BULGULAR

5.1. MDA Bulguları

Spektrofotometrik olarak ölçülen doku MDA düzeyleri, kontrol ve NAS gruplarında benzerdi. Kontrol ve NAS gruplarıyla kıyaslandığında DM grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.05$). DM grubu ile karşılaştırıldığında DM + NAS verilen grupta testis dokularında MDA düzeyi anlamlı olarak azalmış bulundu ($p<0.05$). (Tablo 15).

Tablo 15. Doku MDA değerleri

Grup	MDA (nmol/g protein)
KONTROL	90.75 $\pm$ 0.95
NAS	84.25 $\pm$ 2.21
DM	141.6 $\pm$ 2.21 ^a
DM + NAS	110.50 $\pm$ 8.22 ^{ab}

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b DM grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

5.2.TUNEL Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği testis dokusunda spermatik seri hücrelerde gözlemlendi. TUNEL pozitifliği kontrol (Şekil 14) ve NAS (Şekil 15) gruplarında benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM (Şekil 16) grubunda anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$) (Şekil 17). DM grubu ile kıyaslandığında DM + NAS (Şekil 18) grubunda ise anlamlı bir azalma vardı

($p<0.05$). Negatif kontrolde (Şekil 19) TUNEL pozitifliğine rastlanmadı. Pozitif kontrol (Şekil. 20) için sıçan meme dokusu kullanıldı. (Tablo 16). Skala bar: 50 μ m.

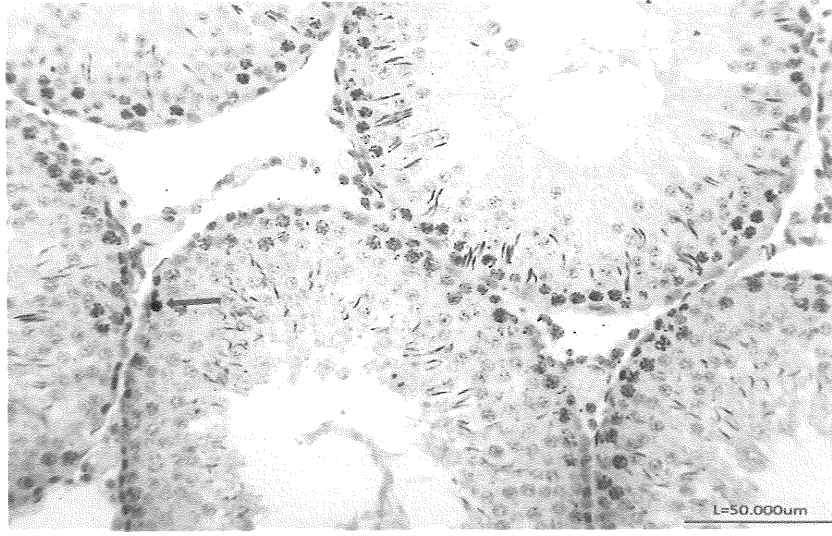
Tablo 16. Apoptotik indeks (%)

Grup	Apoptotik İndeks (%)
KONTROL	1.75 $\pm$ 0.50
NAS	2.25 $\pm$ 0.50
DM	6.75 $\pm$ 0.50 ^a
DM + NAS	2.50 $\pm$ 0.57 ^b

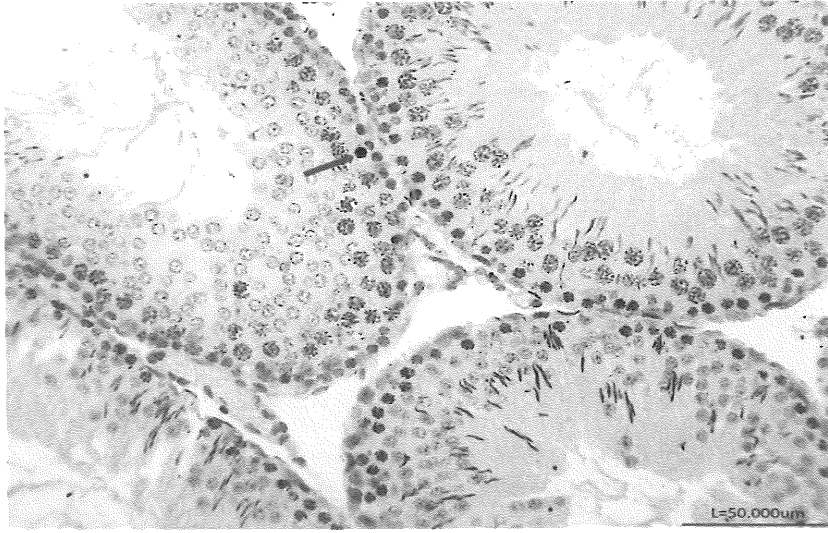
Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

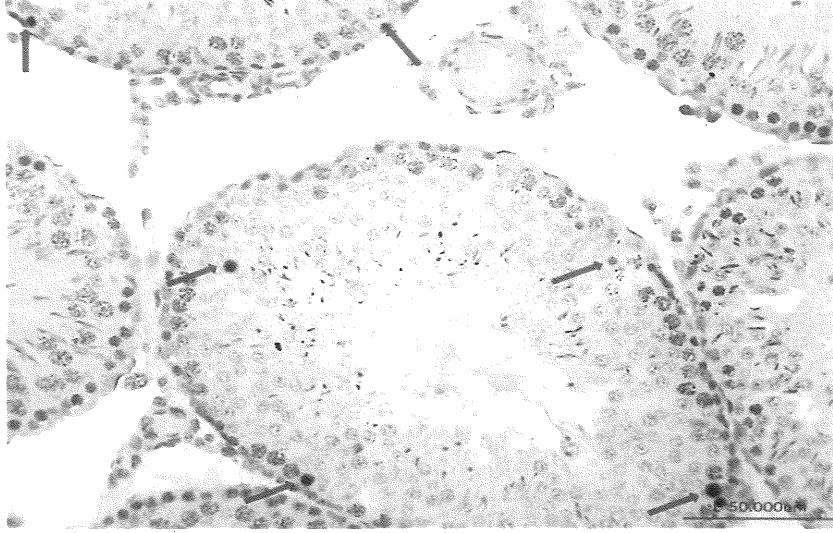
^b DM grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



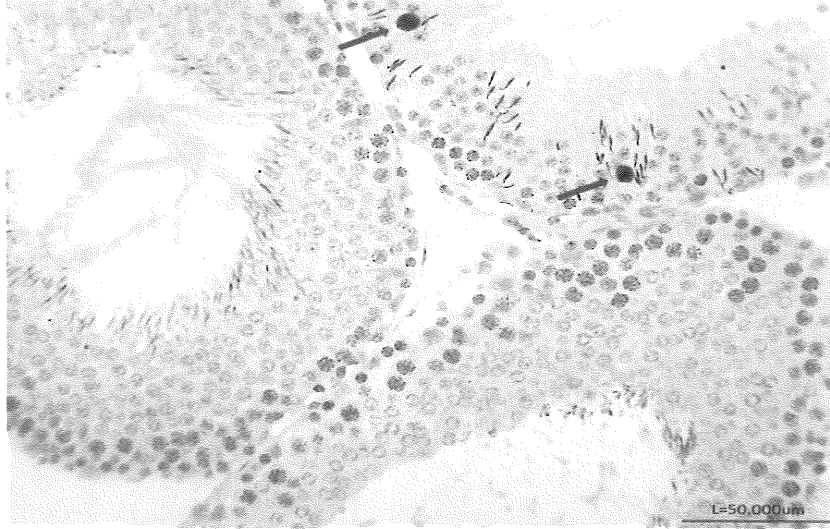
Şekil 14. Kontrol grubu TUNEL pozitif hücre



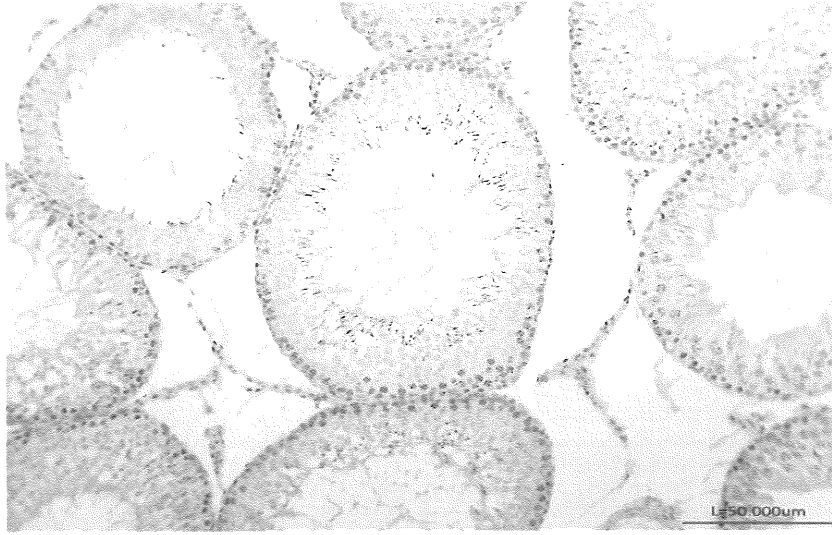
Şekil 15. NAS grubu TUNEL pozitif hücre



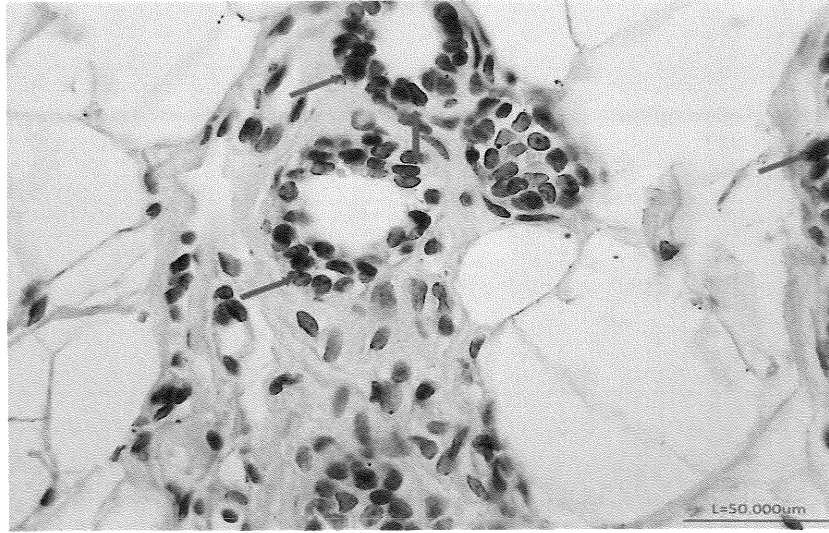
Şekil 16. DM grubu testis dokusunda artmış TUNEL pozitif hücreler



Şekil 17. DM+NAS grubu TUNEL pozitif hücreler.



Şekil 18. Negatif kontrol. TUNEL Testis dokusu



Şekil 19. Pozitif kontrol. TUNEL Meme dokusu

5.3.TRPM2 İmmünreaktivitesi

TRPM2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TRPM2 immünreaktivitesi testis dokusunda peritubüler (siyah ok) ve interstisyel (kırmızı ok) alanda görüldü.

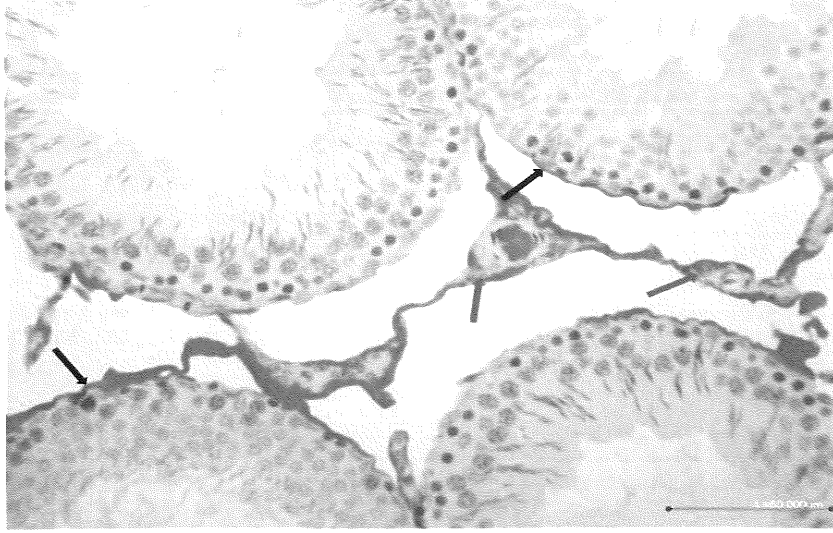
TRPM2 immünreaktivitesi kontrol ( ekil 20) ve NAS ( ekil 21) gruplarında benzerdi. Kontrol grupları ile kar ıla tırıldı ında DM ( ekil 22) grubunda anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$) DM grubu ile kıyaslandığında DM + NAS ( ekil 23) grubunda ise anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. (Tablo 17). Skala bar: 50 m.

Tablo 17. TRPM2 immünreaktivitesi.

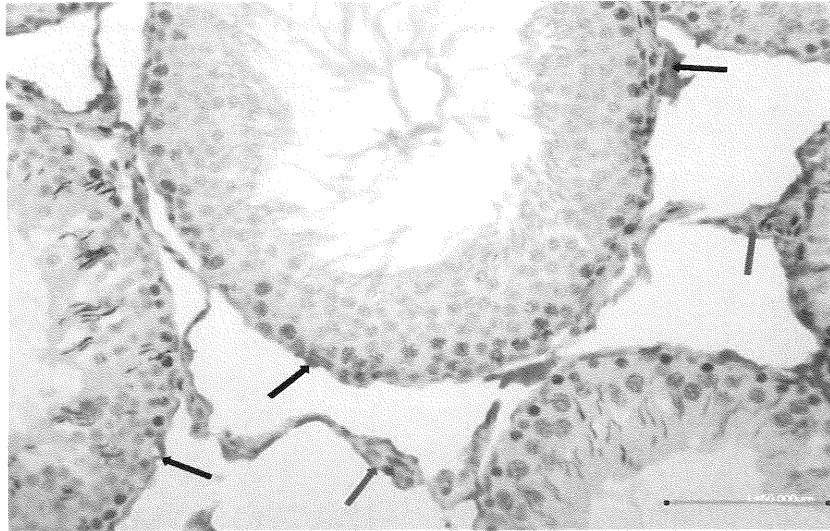
Grup	TRPM2 immünreaktivitesi
KONTROL	3.83 ± 0.40
NAS	3.66 ± 0.51
DM	1.83 ± 0.40^a
DM + NAS	2.16 ± 0.40

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

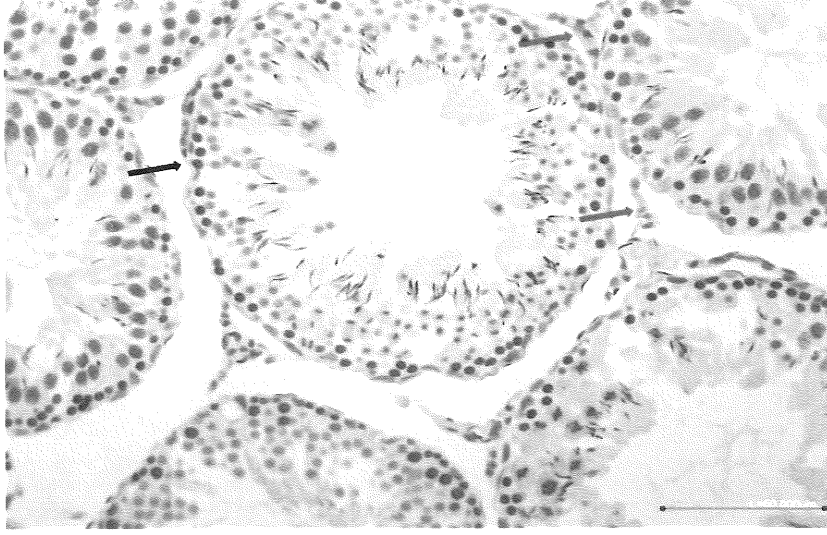
^a Kontrol grubuna göre kar ıla tırıldı ında, ($p<0.05$).



Şekil 20. Kontrol grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.



Şekil 21. NAS grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.



Şekil 22. DM grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.



Şekil 23. DM+NAS grubuna ait testis dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi.

5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bulguları

TRPM2 için yapılan PZR çalışması sonucu; testis dokusunda kontrol grubu ve NAS gruplarında TRPM2 mRNA düzeyleri benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$). DM grubu ile kıyaslandığında DM + NAS grubunda ise anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$) (Tablo 18).

Tablo 18. TRPM2 mRNA düzeyleri.

Grup	mRNA düzeyi kat artışı
KONTROL	1 ± 0.081
NAS	0.9 ± 0.40
DM	0.55 ± 0.081^a
DM + NAS	0.9 ± 0.40^b

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b DM grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

6.TARTIŞMA

DM insülinin hormonunun sentezlenmemesine veya yeterli düzeyde olmamasına bağlı olarak gelişmekte olup kan şekeri seviyesindeki artışla (hiperglisemi) ile karakterize olan bir hastalıktır. İnsülin eksikliği ve insüline karşı gelişen direnç de DM oluşumunda rol oynamakta ve buna bağlı olarak protein, karbohidrat ve lipit metabolizmasında bir takım değişimler meydana getirebilmektedir (129). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında bağlantı olduğu görüşü yapılan in vivo çalışmalar ile de gösterilmiş olup ayrıca araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, hem LDL'nin oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışların olduğu bulunmuştur. Diyabetik olgularda, lipidlere ilave olarak protein oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kollajen, elastin ve miyelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonlar gelişmektedir (48). DM'nin gelişiminde doğrudan ya da dolaylı olarak pankreas dışındaki faktörlerin etkisi de bulunmaktadır. Nörolojik bozukluklar, sağlıksız beslenme, yağlılık, kalıtsal etmenler, karaciğer, enfeksiyon, böbrek üstü bezleri, tiroit ve hipofizdeki patolojik değişimler bu hastalığın nedenleri arasında yer almaktadır (130).

Ayrıca Son yıllarda oksidatif stresin; DM, obezite, kanser, yaşlanma, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, hipertansiyon, apoptozis, kardiyovasküler hastalıklar ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların patogenezinde rolü olduğu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Deneyisel olarak diyabet oluşturulan ratlarda veya diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (132). Dış orbitallerin de bir veya birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan serbest oksijen radikalleri, kısa ömürlü, kararsız ve çok etkili moleküller olup oksidatif stres ile yakından ilişkilidir(130). Yapılan çalışmalarda Diyabette bağlı olarak artan oksidatif stresin reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin aşırı üretimini tetiklediği görülmüştür (52). Diyabet ve diyabete bağlı oluşan komplikasyonların reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini açıklayan çalışmalarda; enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizması değişiklikleri sonucunda ortaya çıkan metabolik stres, sorbitol yol aktivasyonu, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucunda gerçekleşen doku hasarlarının serbest radikal oluşumunu artırdığı ileri sürülmektedir (133).

DM' nin uzun zamandan beri bilinen bir sonucu da anormal sperm yapımına bağlı olarak üreme sistemi üzerindeki negatif etkisidir (134). Sanayisi gelişmiş toplumlarda artan tip I ve tip II diyabete bağlı olarak erkeklerde infertilite oranlarının arttığı bildirilmiştir (51). Diyabet penil ereksiyon ve ejakülasyonu etkilemekte olup spermatogenez üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmış olup (52). Deney hayvanlarında ve insanlarda yapılan çalışmalarda DM' nin, üreme fonksiyonlarını etkileyerek, düşük testosteron düzeyleri, testiküler disfonksiyon ve yetersiz spermatogeneze sebep olduğu gösterilmiştir (135).

STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabet modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda seminifer tübül üzerinde bulunan reseptörlerin (FSH, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I)) diyabete bağlı olarak olumsuz etkilenmeleriyle FSH sentezinin azaldığı testosteron seviyesinin düştüğü ve buna bağlı olarak Leydig hücrelerinde meydana gelen LH sentezinin azaldığı bildirilmiştir (55). Bunun yanı sıra diyabetin testosteron seviyesinde meydana getirdiği azalma, testiküler disfonksiyon ve spermatogenez üzerindeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalarda bildirilmiş olup diyabetin, üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri saptanmıştır. Aynı zamanda diyabete bağlı olarak testislerde, tunika albugineada, seminifer tubüllerde, interstisyel bağ dokusunda ve Leydig hücrelerinde meydana gelen olumsuz histolojik değişiklikler bildirilmektedir (55).

Androjen ve spermilerin üretildiği testisler antioksidan elemanlar vasıtasıyla korunuyor olmasına rağmen endojen ve eksojen kaynaklı faktörler oksidatif stres meydana getirmekte ve testisler üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır (56). Bunların sonucunda; Spermatozoa ve erkek germ hücrelerinde DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk ve son olarak oksidatif stres ile birlikte lipid peroksidasyonunun indüklenmesine neden olmaktadır (136). Hücrenin canlılığını koruyabilmesi ve gerekli olan hücresel fonksiyonların devam ettirmesin'de iyon kanalları hücre zarında çok önemli bir role sahiptir (137). Hücre zarında bulunan iyon kanallarından biride oksidatif stres ile aktiveleşebilen TRPM2 kanallarıdır (138). TRPM2 kanalları başlıca kemik iliği ve beyin olmak üzere bağırsak, karaciğer, böbrek, pankreas, akciğer, iskelet kası, testis, prostat, lökositler ve arka kök gangliyonları gibi birçok doku ve hücrede varlığı belirlenmiştir (139).

Bu kanallar sodyum ve potasyuma geçirgen olmasının yani sıra hücreye kalsiyumun girmesinde 'de oldukça önemli bir role sahiptir (140). Diyabette bağlı olarak artan oksidatif stresin reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin aşırı üretimini tetiklediği görülmüştür (52).

Serbest radikaller bağışıklık sistemi hücreleri (nötrofil ,makrofaj vs)için gerekli olsada aşırı üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır (48). TRPM2 kanalı oksidatif stres tarafından aktive olabildiği için, son zamanlarda, şeker hastalığı, inflamasyon, miyokardiyal enfarktüs ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı potansiyel bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmıştır (99). Oksidatif stres ile aktifleşen TRPM2 katyon kanalları doku, organ ve sistemlerde bir takım fonksiyon bozuklukları meydana getirebilmektedir (141). Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır (142).

Hücre içi elektron dengesinin bozulması, Oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptoz oluşumunu tetikleyebilmektedir (111).

Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde NAS'in, sıçan testis dokusundaki apoptotik değişiklikler üzerine koruyucu etkileri ve TRPM2 kanal aktivasyonundaki rolü incelenmiştir.

Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diyabetik grupta testis dokusunda MDA ve apoptotik hücre sayısı belirgin olarak artmışken tedavi olarak NAS verilen grupta ise anlamlı olarak azalma vardı. Çalışmamızdaki bu bulgular birçok çalışma ile paralellik göstermekteydi. NAS mukustaki disülfid bağlarıyla etkileşerek, mukoproteinleri parçalar ve mukusun vizkozitesini azaltır. Mukolitik ilaçlar hücre içinde sistein' in miktarında artış meydana getirmektedirler. Hücre içinde artan sistein'nin zaman içerisinde glutatyon sentezini artırarak antioksidan özellik gösterdiği keşfedilmiştir (63). Ayrıca akciğer hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, metal toksisitesi, karaciğerin parasetamol toksisitesi, Römatooid artrit, siklofosfamide bağlı oluşan hemorojik sistitte etkilidir (64).

Ayrıca hücreyi koruyucu ve antioksidan özellikleri de vardır. Antioksidan özelliğini, GSH seviyelerini düzenleyerek, doğrudan radikalleri temizleyerek, nötrofil aktivitesi ve TNF üretimini baskılayarak gerçekleştirmektedir. NAS hücre içindeki proteinlerin aktivitelirinin düzenlenmesine yardımcı olduğundan apoptoz oluşumunda engellediği bilmekte olup endotel disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erezyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon olaylarında NAS önemli rol oynamaktadır (65).

Çalışmamızda en dikkat çekici bulgu ise diyabetik grupta TRPM2 artışı beklenirken kontrol grubuna göre belirgin azalmasıydı. Bu bulgu yapılan birçok çalışmayla zıtlık göstermekteydi. Nazıroğlu ve ark. Bütiyonin sülfoksimin (BSO) ile GSH yetersizliği oluşturulan arka kök ganglion (AKG) sinir hücrelerinde 24

saatlik deney süresi sonunda TRPM2 kanallarının daha fazla aktive olduklarını ve hücre içi GSH verildiğinde ise kanalların tamamen, hücre dışı inkübasyonlarında ise kısmen inhibe olduklarını gözlemlenmiştir (142). Yapılan bir başka çalışmada ise glial aktivasyonunun bir sonucu olarak TRPM2 iskemik yaralanma sonrası 1 ve 4. haftalarda artış gösterdiği görülmüş olup, bu da TRPM2 'nın kısa süre zarfında yoğun olarak üretildiği ve iskeminin patofizyolojisinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (144).

Miller ve ark. kalp üzerinde 2 saat hipoksi sonrası yarım saat reoksijenizasyonun ardından serbest oksijen radikallerinin ortamda yüksek seviyelere çıktığını tespit etmişlerdir (144). Bu bulgular ışığında çalışmamızdaki TRPM2 düzeyinin diyabet oluşturulan sıçanlarda geç dönemde düzeyinin düşük olmasının sebebi olarak, DM'nin erken döneminde oksidatif hasarın fazla olabileceği ve neticesinde TRPM2 kanallarının paralel olarak erken dönemde artışı ve aşırı ekspresyonu, iyileşme yani geç dönemde de tüketilmişliğin ve kullanımın neticesiyle düzeyinin düşmüş olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, deneysel diyabetin testis dokusunda MDA ve apoptotik hücreleri arttırdığı, TRPM2 seviyelerini azalttığı, tedavi olarak verilen NAS'ın MDA ve apoptotik hücreleri azalttığı, diyabetin testis dokusunu etkilemesinin patofizyolojisindeki rolünün aydınlatılabilmesi için gelecekte farklı deneysel diyabet süreleriyle yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi. 2. Baskı, Ankara: Medipress Matbaacılık Yayıncılık Ltd, 2002: 291-292.
2. Prof. Dr. F Dere. Anatomi. 1. Baskı Adana: Okullar Pazarı Kitabevi, 1990: 291-293.
3. Histology images" www.urology-textbook .com -histology images 05.9.2014.
4. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 4. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 2006: 330-332.
5. Kuran O. Sistematik anatomi. 1. Baskı İstanbul: Filiz Kitabevi, 1983:512-514.
6. Snell RS. Clinical Anatomy. 3rd ed. Boston: Brown and Company, 1986 : 314-316.
7. Langman J, Medical Embryology 4th Edn. Philadelphia: Williams and Wilkins, Baltimore, 1996: 280-281.
8. Sadler T. Langman's Medical Embryology 9. th Edn . Ankara: Williams & Wilkins, Baltimor, 2005 : 279-281.
9. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, ScienceDirect. The developing human: clinically oriented embryology. 6th Ed, Saunders, 1998
10. Junquera LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 419.
11. Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya: Pelikan Tıp Yayıncılık, 2004 : 305-308.
12. Marieb E. Human Anatomy and Physiology, 5th edition, Benjamin Cummings, San Francisco 2001: 567-588.
13. Eroschenko P, Difiore V. Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Demir R (Çeviren). 10.baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2008:355-359.
14. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. USA, WB Saunders, 2001.
15. www.histol.chuvashia.com -histology images 05.9.2014.
16. Erkoçak A. Özel Histoloji. 4.baskı Ankara: Ajans Türk Basımevi, 2001:318-319.

17. Jangueria LC. Carneiro J, Kelley RO. Temel histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S., Ahışalı B. (Çeviri Editörleri), Barış kitabevi, 1998 : 422.
18. Ross MH, Kaye GI. and Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Taylor C. Scogna KH. Ajello JP 2006: 710-711.
19. Guyton AC, Hall EJ. Textbook of Medical Physiology. 11th Ed. Philadelphia: Saunders, 2006.
20. Yörem A, Özata M. Diabetes mellitus tanısı, sınıflaması, klinik özellikler. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006; 275-283.
21. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 51-62.
22. Avcı A. Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi ve E Vitaminin Etkileri. Ankara Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2001: 56.
23. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). İç Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005; 2279-2295.
24. Özata M, Yörem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006: 275-427.
25. Satman I, Yılmaz T, Sengul A, Salman S, ark. The TURDEP group: Population- based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: result of the Turkish diabetes epidemiology study. Diabetes Care 2002; 25: 1551-1556.
26. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2004; 27: 5-10.
27. World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
28. Kelestimur F, Cetin M, Pasaoglu H, ark. The prevalance and identification of risk factors for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Kayseri, Central Anatolia, Turkey. Acta Diabetol 1999; 6: 85-91.
29. Altuntaş Y. Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflaması. Yenigün M (editör). Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001: 51-62.

30. 29. Başkal N. Diabetes mellitusta akut metabolik dekompanseasyonlar. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). İç Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005: 2311-2321.
31. Gedik O. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları. Erdoğan G (editör). Koloğlu Endokrinoloji Temel Ve Klinik. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel yayıncılık, 2005: 367- 383.
32. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım, 1995: 201-202.
33. Weiseger R.A. Oxygen Radicals and ischemic tissue injury. Gastroenterology 1986: 494-496.
34. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emami B, Fooladian F, Zafari K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 2003; 135: 331-336.
35. Ames Bn, Shigenaga, Mk, Hagen, Tm. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 17:7915-22.
36. Gate L, Paul J, Ba G.N. Tew, K, Tapiero, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomedecine & Pharmacotherapy 1999; 53 : 169-180.
37. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. New York. Oxford Science Publications 1999 ; 60: 110-111
38. Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-- cause or consequence of tissue injury Gen Physiol Biophys 2005; 24 :263-78.
39. Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. Basic Life Sci 1990; 52 : 119-25.
40. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin 1993; 49: 481-493.
41. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and antioxidative mobilization in burn injury 2008; 34: 6 –17.
42. Gordon CA, Himmelfarb J. Antioxidant therapy in uremia. Evidence-Based medicine Seminars in Dialysis 2004; 17: 327-332.

43. Valko M, Leibfritz D, Mancol J, Cronin , et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology* 2007; 39: 44-84.
44. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1992; 50: 335-339
45. Boynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
46. Kaneko J , J Harvey, J Bruss, *Clinical biochemistry of domestic animals: 2th Ed.* Philadelphia: Academic Pr. 1997
47. Kleczkowski, M. Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle-nonenzymatic mechanisms. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2003; 6: 301.
48. Altan N., Dinçel A., Koca C., *Diabetes Mellitus ve Oksidatif stres Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 : 51-56.
49. Kajimoto Y, Kaneto H., Role of Oxidative Stress in Pancreatic-Cell Dysfunction, *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2004; 65: 168–176.
50. Robertson Rp, Harmon J, Tran Po, Poitout V β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2009; 40 :119-124.
51. Mallidis C, Green BD, Rogers D, Agbaje IM, Hollis J, Migaud M, et al. Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Int J Androl* 2009;32: 156-65.
52. Agbaje IM, Rogers DA, Mcvicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction* 2007; 22: 1871-7.
53. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fak Derg* 2005; 3: 30-9.
54. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pbad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci* 2007;81(13):1079-84.
55. Öztürk F, Ağkadir M, Yağmurca U. Deneysel Diyabetin Sıçan Testislerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. *T Klin J Med Sci* 2002; 22:173–178.

56. Ballester J, Munoz Mc, Dominguez, J, Guinovart J, İnsulin dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms, *J Androl* 2004; 25:706-19.
57. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999; 61: 393–399.
58. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 1996; 16: 33-50.
59. Yanbeyi S, Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun 1999
60. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Botany* 2003; 91: 179-194.
61. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
62. www.wikipedia.org/N-asetilsistein images 05.8.2014.
63. Jones L, Jarvie D, Simpson D. Pharmokokinetics of N-acetylcysteine are altered in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11:787-791.
64. Ventresca G, Cicchetti V , Ferrari V, Thiols, Medical Department, Zambon group, Italy, 1989
65. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:6-20.
66. Welin D, Novikova L, Wiberg M, Kellerth J, Novikov L. Effects of N-acetyl-cysteine on the survival and regeneration of sural sensory neurons in adult rats 2009; 1287: 58-66.
67. Yogesh T. Effect of N-acetylcysteine on myocardial infarct size following ischemia and reperfusion in dogs. *Indian J Physiol Pharmacol* 1998; 42:50-56.

68. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, et al., Effect of low-dose N-acetyl-cysteine infusion on tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury in arthroscopic knee surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 847-851.
69. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in *Escherichia coli* endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 730-734.
70. Sekharam M, Trotti A, Cunnick JM, Wu J. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-Acetyl cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 210–216.
71. Van Zandwijk N. N-acetyl cysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer 1995; 22: 24-32.
72. Cummings B. *Get Ready for Biology*. San Francisco: Pearson Education Inc 2007.
73. Abe K, Puertollano R. Role of TRP Channels in the Regulation of the Endosomal Pathway. *Physiology (Bethesda)*. 2011; 26 :14-22.
74. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 1969; 224: 285–287.
75. Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg* 2007; 162: 244–253.
76. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007 ; 387-417.
77. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol* 2011; 589: 1515–1525.
78. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426:517-524.
79. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Liedtke WB, Heller S, editors. Boca Raton (FL): CRC Press 2007: 213-214.
80. Hardie C, Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol* 2003; 55: 735-736.
81. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 387–417.

82. Tsuruda P, Julius D. Coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 2006; 73: 201-12.
83. Chuang, H. H., Neuhauser, W. M. & Julius, D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* 2004; 89: 859-861.
84. Montell, C. TRP channels: it's not the heat, it's the humidity. *Curr Biol* 2008; 123-126.
85. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca^{+2} signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2012 ;32: 134-141.
86. Fleig A, Penner R. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(12): 633-639.
87. Clapham D. Snapshot: mammalian TRP channels. *Cell* 2007; 129-130.
88. Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V. Voltage dependence of the Ca^{+2} activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem.* 2003; 33: 30813-30815.
89. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therapeut* 2008; 118: 337-351.
90. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Molecular cloning of a novel putative Ca^{+2} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998; 54(1): 124-131.
91. Perraud A, Shen B, Dunn C, et al. NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem* 2003; 278(3): 1794-1801.
92. Clapham D. Calcium signaling *Cell* 2007; 14;131(6): 1047-1058.
93. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411(6837): 595-599.
94. Tong Q. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca^{2+} sensor calmodulin. *J Biol Chem* 2006; 90: 76-85.
95. Scragg J, Boyle L, Nilius P. CH_2O_2 -stimulated Ca^{+2} influx via TRPM2 is not the sole determinant of subsequent cell death. *Pflugers Arch* 2008; 1141-51.

96. Chen Q, Olney JW, Lukasiewicz PD, Almlı T, Romano C. Fenamates protect neurons against ischemic and excitotoxic injury in chick embryo retina. *Neurosci Lett* 1998; 242(3): 163–166.
97. Zhang W. TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol C* 2006;11:46-49.
98. Nazıroğlu M, Özgöl C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca^{+2} influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol.* 2011; 241 (2): 69-75.
99. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* 2011; 50(3): 279–287.
100. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002; 277: 23150–23156.
101. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, et al. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 2006; 25 : 1804–1815.
102. Jiang LH, Yang W, Zou J, Beech DJ. TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(9): 973–988.
103. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of Oxidative Stress in Pancreatic-Cell Dysfunction, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1011: 168–176.
104. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 395-419.
105. Hengartner MO, Ellis RE. and Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-499.
106. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ and Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Biol* 1995 ; 6: 3-16.
107. Wyllie AH . Apoptosis:an overview. *BrMed Bull* 1997; 53:451-465.
108. Thompson CB. Apotosis in the pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopatho* 1995; 267: 1456-62.

109. Chen Q, Fisher AB, Strayer DS, Bates SR. Mechanism for secretagogue-induced surfactant protein A binding to lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: 38-46.
110. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.
111. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
112. Hızel N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; 6 :196-197
113. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 665-73.
114. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer.* 1994; 14: 2068-73.
115. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171-178.
116. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
117. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl* 1998; 19:487-497.
118. Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, et al. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol.* 1999; 17: 296-300.
119. Hsueh A, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Celi Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996; 51: 432-457.
120. Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of celi types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 825-830.
121. Spontaneous germ celi apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death, *J Clin Endoc and Metab* 1998 ; 83:152-162.
122. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol* 2000; 86: 598-606.

123. Karaboğa F. Deneysel Diyabetik Fare Beyin Dokusundaki Apoptotik Değişiklikler Üzerine D₃ Vitamininin Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Noroloji Anabilim Dalı, 2010.
124. Schandalik R, Gatti G, Perucca E. Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silmarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 964-8.
125. Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7490-7495.
126. Kang JS, Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 and prostaglandin E2 synthesis by silmarin. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 175- 81.
127. Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA. Hepatoprotective mechanism of silmarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 51-63.
128. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 2008.
129. Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJ, Roemen THM, Vusse, G.J.V. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats, *Biochem. J* 2003 ; 371: 753-760.
130. Yılmaz B. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. 1. Baskı. Ankara: Feryal Matbaacılık 1999: 267-269.
131. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc* 1987; 46 : 13-26.
132. Ak H, Dingiloğlu. "Plasma lipid peroxidation, Vit. E, superoxide dismutase and glutathione peroxidase alterations in coronary atherosclerosis" *Tr J Med Sci* 1994; 26: 11-15.
133. Boynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
134. Ficher M, Zuckerman M, Fishkin RE, et al. Do endocrines play an etiological role in diabetic and nondiabetic sexual dysfunctions *J Androl* 1984 ; 5 : 8-16.

135. Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214 :1-11.
136. Crawford JM, Cotran RS. The Pancreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T eds *Pathologic Basis of Disease*. USA: WB , Saunders Company 1999: 913-920.
137. Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res* 2008 ; 33 (7): 56-62.
138. Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci* 2008; 270 (1-2): 52-8.
139. Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost* 2009; 101 (4) : 19-25.
140. Nishida M, Hara Y, Inoue R, Mori Y. TRP channels: formation of signal complex and regulation of cellular functions. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2003 ;121 (4) :223-32.
141. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflügers Arch* 2005 ; 51 (1) : 12-22
142. Halliwell B Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49(10): 1341-1348.
143. Nazıroğlu M, Özgül C, Çiğ B, Doğan S, Uğuz AC. Glutathione modulates Ca⁺² influx and oxidative toxicity through TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J Membr Biol*. 2011 ; 242 (3):109-118.
144. Fonfria E, Mattei C, Campbell CA, Benham CD, et al. TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. *J Recept Signal Transduct Res* 2006; 26 : 179-198.
145. Miller BA, Wang J, Zhang X, et al. The second member of transient receptor potential-melastatin channel family protects hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304: 1010–1022.

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1988 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2004 yılında Elazığ Fırat Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2008 yılında aynı fakülteden mezun oldum. İnvitrolab'da biyolog olarak çalışmaya başladım. 2010 yılında Fırat Üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, Tezsiz Yüksek Lisansı kazandım 2011 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl içinde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji programında yüksek lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.

