

ÖZGÜN MAKALE/ORIGINAL ARTICLE

Diyabetik Sıçanların Testis Dokusunda VEGF ve Bcl-2 Ekspresyon Düzeylerinin İmmünohistokimya ve Western Blot Yöntemleri İle İncelenmesi**Examining the Expression Level of VEGF and Bcl-2 By Immunohistochemistry and Western Blot in Testis Tissue of Diabetic Rats**Sevgi İrtegin¹, Engin Deveci²¹ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye**Corresponding author:** Sevgi İrtegin, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, 21280, Türkiye

Email: irteginsevgi@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada diyabetik sıçanların testis dokusunda anjiogenezi ve vasküler geçirgenliği stimüle eden vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) ve apoptozis regülasyonunda önemli bir rol oynayan B-cell lymphoma-2' nin (Bcl-2) ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Bu çalışmada 20 adet erişkin Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol ve Diabetes mellitus (DM) olmak üzere 2 eşit gruba ayrıldı. DM oluşturmak için sitrat tamponunda çözülmüş tek doz Streptozotosin (STZ) (55mg/kg) intraperitoneal olarak verildi. %10' luk formaldehit solüsyonuna atılan testis dokuları rutin parafin takiplerinden sonra histopatolojik olarak incelendi. VEGF ve Bcl-2 protein düzeyleri immünohistokimya ve Western Blot yöntemleriyle ölçüldü.

Bulgular: Diyabetik gruba ait spermatik hücrelerin bazılarında dejenerasyon, çekirdekte küçülme ve yer yer piknosis gözlemlendi. Diyabet sonucu Sertoli hücrelerinde yapısal değişiklikler saptanırken, tubuller arasındaki damarlarda dilatasyon ve hemoraji gözlemlendi. Diyabetin etkisi ile testis dokusunda VEGF ekspresyonunun bloke olduğu, Bcl-2 ekspresyonunun ise azaldığı saptandı.

Sonuç: Diyabetik testis dokularında VEGF ekspresyonunun bloke olmasının yetersiz anjiogenez ve vasküler permeabiliteye neden olabileceği olasıdır. Ayrıca diyabetik testis dokularında anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonundaki azalmanın diyabetin testiküler dokuda apoptozis regülasyonunun bozulmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, testis, VEGF, Bcl-2

Abstract

Objectives: In this study, we aimed to investigate the expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) which stimulates angiogenesis and vascular permeability and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) which plays an important role in the regulation of apoptosis in testis tissue of diabetic rats.

Methods: Twenty adult Wistar albino rats were used in this study. The rats were divided into two equal groups as control and Diabetes mellitus (DM). Single dose of Streptozotosin (STZ) (55 mg/kg) dissolved in citrate buffer was injected intraperitoneally to induce DM. Tissue pieces which had been soaked in 10% formaldehyde solution were examined histologically after routine parafin follow. The expression levels of VEGF and Bcl-2 were measured by immunohistochemistry and Western Blot techniques.

Results: It was observed that some spermatid cells had degeneration, nuclear contraction and picnosis in some places in DM group. While structural changes were determined in Sertoli cells, dilation and hemorrhage were observed in vessels between tubules. It was determined that VEGF expression was blocked in diabetic testis tissues, while the expression of Bcl-2 was reduced.

Conclusion: Depletion of VEGF expression in diabetic testis tissues may lead to inadequate angiogenesis and vascular permeability. Moreover, a decrease in the expression of anti-apoptotic Bcl-2 in diabetic testis tissues suggests that DM may cause dysregulation of apoptosis in testicular tissue.

Key words: Diabetes mellitus, testis, VEGF, Bcl-2

GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) dünyada yüz milyondan fazla insanı etkileyen ve en yaygın görülen kronik hastalıklardan biridir. DM kalp, göz, böbrek, sinir sistemi, damar sistemi ve kemik dahil olmak üzere birçok organda uzun süreli hasara yol açan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabet, insülin salınımindaki eksiklik sonucu (tip-1 diyabet) veya dokunun insüline karşı olan duyarlılığındaki azalma sonucu (tip-2 diyabet) gelişmektedir [1-3].

Kronik seyirli hiperglisemi reproduktif komplikasyonlara neden olabilmektedir. Yüksek glukozun testis hücrelerinde oksidatif stres artışına ve apoptozise neden olduğu ve dolayısıyla infertiliteye katkıda bulunduğu rapor edilmiştir [4-6]. Yapılan bir çalışmada diyabetik sıçanlarda oksidatif stres artışının testiste DNA hasarına, sperm hücrelerinin kaybına ve spermatogenezde gecikmeye neden olduğu belirtilmiştir [5]. Benzer şekilde başka bir çalışmada diyabetin sıçanlarda testis dokusundaki germ hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden olduğu ve infertilitenin ana nedeni olduğu gösterilmiştir [6].

Kandaki glukoz oranının yüksek olması kan damarlarına zarar vererek endotelial disfonksiyona neden olabilir. Bu nedenle DM kardiovasküler hastalıklar için bir risk faktörüdür [7]. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinen vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), damar duvarı endotel hücrelerinin çoğalması ve geçirgenliğinin artmasına neden olan anjiogenik bir faktördür [8,9]. VEGF' nin spermatogenez sürecinde proliferasyon ve farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir [10].

DM' nin apoptozis yolağını indükleyerek testiküler hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Deneysel çalışmalar hücrel apoptozisin hipergliseminin indüklediği oksidatif stres sonucu oluşan testiküler hasardan kaynaklandığını göstermiştir [11,12]. Apoptozis belli fonksiyonel gen ve bunların protein ürünleri tarafından regüle

edilmektedir. Bcl-2 mitokondrinin iç membranında bulunan bir protein olup apoptozisi bloke eder. Bcl-2 proteini sitokrom-c' nin mitokondriden sitoplazmaya geçişini önleyerek serbest radikal üretiminin azalmasına neden olur ve bu nedenle antioksidan bir özelliğe sahiptir [13].

Streptozotosin (STZ) kimyasalı sıçanlarda deneysel hiperglisemiyi indükleyen diyabetojenik ajan olarak kullanılmaktadır [14]. STZ pankreas β hücrelerinin aşırı serbest radikal üretmesine neden olduğu için insülin biyosentezini ve salgılanmasını azaltır ve bunun sonucu olarak hiperglisemiyi indükler [15]. Bu nedenle STZ deneysel çalışmalarda DM' nin hücre ve dokular üzerindeki etkilerini araştırmak için yaygın olarak kullanılan faydalı bir çalışma modelidir.

Bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş olan sıçanların testis dokularında hücre proliferasyonu, anjiogenez ve apoptozis regülasyonu için önemli rolleri olan VEGF ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon düzeylerini immünohistokimya ve Western Blot yöntemleri ile araştırmayı amaçladık.

YÖNTEMLER

Deney hayvanları ve deneysel diyabetin oluşturulması

Çalışmanın etik onayı Dicle Üniversitesi deney hayvanları etik kurulundan alınmıştır. Bu çalışmada 20 adet erişkin Wistar albino sıçan kullanıldı. Kontrol grubu (n=10) ve Diabetes mellitus (DM) grubu (n=10) olmak üzere 2 eşit gruba ayrıldı. DM oluşturmak için sitrat tamponunda çözülmüş tek doz STZ (55mg/kg) intraperitoneal (i.p) olarak verildi. Kontrol grubuna i.p placebo sitrat tamponu verildi. Diyabet oluşturulan gruptan 48 saat sonra kan alınarak glukoz düzeyi 140 mg/dL'den yüksek olanlar alındı (Tablo 1). 3. haftanın sonunda ketamin anestezisi altında kan örnekleri alınarak glukoz değerleri incelendi. Karın bölgesinin alt kısmından diseksiyon yapılarak testis dokusu çıkarıldı. Testis dokuları %10' luk

formaldehitte fikse edildikten sonra, yıkama, dehidratasyon ve şeffaflaştırma işlemleri ardından 58 °C de parafin bloklara alındı.

Tablo1: Kontrol grubu ile Diabetes mellitus grubunun glukoz değerleri

	Kontrol (n=10)	Diabetes mellitus (n=10)	*p
Glukoz (mg/dL) ± SD	97,28±5,34	404,14± 29,81	<0.001

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyama

Parafine gömülü testis dokularından 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler deparafinizasyon işleminin ardından alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer Hematoksilen-Eozin boyası (HE) 2 dk uygulandı. Boyanan kesitler distile su ile yıkandıktan sonra alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ışık mikroskobunda (Nikon) değerlendirildi.

Preparatlar antijen retrieval için sitrat tamponunda (pH 6.0) mikrodalga fırında 3x5 dk bekletildi. Oda sıcaklığında 10 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler fosfat buffer solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra %3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 10 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler PBS (pH 7.6) ile yıkandı. Daha sonra kesitler anti-Bcl-2 antikor (Santacruz, 1:100) ve anti-VEGF antikor ile (Santacruz, 1:100) muamele edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision,) tutuldu. 3 kez PBS' de yıkanan kesitlere 3x5 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision) uygulandı. PBS ile yıkama sonrasında kesitlere 3-amino 9 etil karbazol (AEC) kromojen solüsyonu 3x8 dk uygulandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra ışık mikroskobunda (Nikon) değerlendirildi.

Western Blot

Hücre lizisi ve total protein ölçümü

Sıvı azotta dondurulmuş testis dokusu porselen havanda toz haline getirildi. 50 mg toz haline getirilmiş testis dokusu proteaz inhibitörü karışımı içeren 250 ul RIPA liziz solüsyonunda 1 saat buz içerisinde bekletildi. Liziz edilmiş testis örnekleri -86 °C de muhafaza edildi. Protein degradasyonunu önlemek için bütün basamaklar buz üzerinde gerçekleştirildi. Total hücresel protein konsantrasyonu BCA kiti (Pierce, Thermo scientific) kullanılarak firmanın talimatlarına uyularak yapıldı. BCA ölçümü 96-kuyucuklu plaka içerisinde mikropilaka okuyucu ile (MultiscanTM GO, Thermo Scientific) yapıldı.

SDS-PAGE

Protein örnekleri 1xSDS yükleme solüsyonunda (%2 SDS, %5 gliserol, %0.01 bromofenol mavisini, %8 DTT) hazırlanarak 5 dk 95 °C sıcaklıkta kaynatıldı. 20 µg total protein örneği %10' luk poliakrilamid jele yüklendi ve SDS koşturma solüsyonunda (2.4 mM Tris, 19.2 mM glisin, %0.01' lik SDS) 200 V' da 1 saat elektroforez edildi.

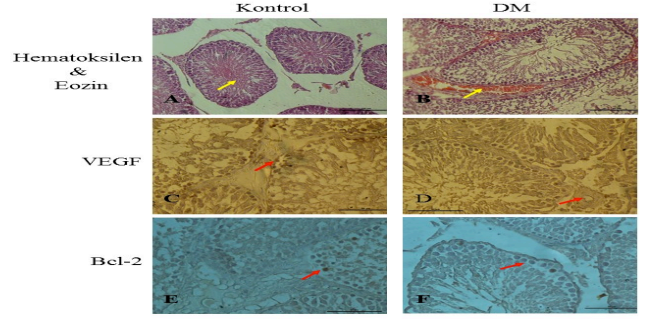
Proteinlerin membrana transferi ve antikorla boyama

Ayrıştırılmış proteinler SDS-PAGE' den 100V' da 1 saat süreyle transfer solüsyonu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 metanol, pH 8.3) içerisinde PVDF membrana transfer edildi. Transferden sonra membran PBS-T (PBS+ %1 Tween-20) solüsyonu içerisinde hazırlanmış %5' lik süt tozu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Bloklama işleminden sonra membran primer antikorlar (anti-VEGF 1:200 dilüsyon Santa Cruz , anti-Bcl-2 1:200 dilüsyon Santa Cruz ve anti-β-actin 1:1000 Abcam) ile 2 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Daha sonra membran 4 defa PBS-T ile 30 dk süre boyunca yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran horseradish peroksidaz konjuge sekonder antikorlarla 1:10000 dilüsyon oranında 1 saat oda sıcaklığında

muamele edildi. Membran tekrar 4 defa PBS-T ile 30 dk süre boyunca yıkandı. Protein bantları ECL kimyasalı (Bio-Rad) kullanılarak görüntüldü. Resimler ChemiDoc™ MP- Bio-Rad cihazı kullanılarak alındı.

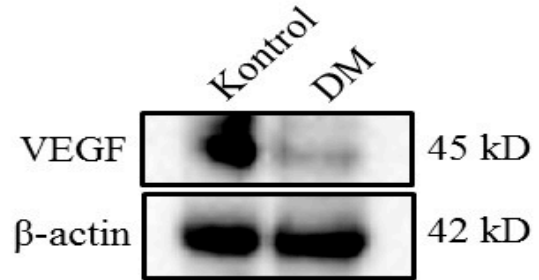
BULGULAR

Kontrol grubu ile diyabet oluşturulan grubun glukoz değerleri karşılaştırıldı (Tablo 1). Diyabet oluşturulan sıçanlarda kandaki glukoz konsantrasyonu önemli ölçüde artmıştır ($p<0.01$, Tablo 1). Kontrol grubuna ait testis kesitlerinde seminifer tübüllerdeki spermatik hücreler lümene doğru düzenli sıralanmış aralarında tabanları geniş uç kısımları dar olan Sertoli hücreleri yerleşiktir. Tubuller arası alanlarda tek ve gruplar halinde Leydig hücreleri yer almaktadır (Resim 1A). Diyabet grubu testis kesitlerinde seminifer tübüllerin bazal membranındaki mitotik hücrelerde yer yer dejeneratif değişiklikler izlendi (Resim 1B). Spermatik hücrelerin bazılarında çekirdek yapısında piknosis ve küçülme görüldü. Lümeneye doğru hücrelerde vakuolleşmenin belirginleştiği ve spermatidlerde küçülme olduğu izlendi. Sertoli hücrelerindeki şişkin görünümlü taban kısmının daralması ile birlikte uzun silindirik yapı oluşması hücresel değişikliğin oluşmasına neden olmuştur. Diyabet sonucu tubuller arası alanlarda damar dilatasyonunun arttığı, hemorajinin olduğu ve Leydig hücrelerindeki çekirdeklerde piknosis olduğu görüldü (Resim 1B). İmmünohistokimyasal inceleme sonucunda kontrol grubuna ait testis dokularında VEGF ekspresyonu pozitif olarak saptandı (Resim 1C). Buna karşın DM grubuna ait testis dokularında zayıf VEGF ekspresyonu tespit edildi (Resim 1D). Bcl-2 ekspresyonunun ise DM grubunun testis dokularında kontrol grubuna kıyasla azaldığı izlendi (Resim 1E, 1F).

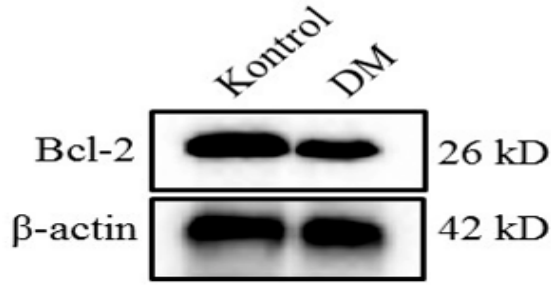


Resim 1: Kontrol ve DM grubuna ait testis dokularının yapısal ve immünohistokimyasal incelenmesi. A, B: Kontrol ve DM grubuna ait testiküler bulgular, HM boyama bar 50 μ m. C,D: Kontrol grubu, interstisyel alandaki kan damarlarında VEGF ekspresyonu pozitif (ok), DM grubunda kan damarı endotelinde VEGF ekspresyonu zayıf (ok), VEGF immün boyama bar 50 μ m. E,F: Kontrol grubunda spermatogenetik hücrelerde Bcl-2 ekspresyonu (ok), DM grubunda spermatogenetik hücrelerin Bcl-2 ekspresyonunda azalma (ok), Bcl-2 immün boyama bar 50 μ m.

Kontrol ve DM grubunun testis dokularındaki VEGF ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon düzeyindeki farklılıklar ayrıca Western Blot yöntemiyle de gösterildi. İmmünohistokimya sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde DM grubuna ait testis dokularında VEGF ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna oranla neredeyse saptanamayacak düzeyde azaldığı gözlemlendi (Şekil 1). Benzer şekilde, Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin DM grubuna ait testis dokularında kontrol grubuna kıyasla azalma gösterdiği tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 1: Kontrol grubu ve Diyabet grubu testis dokusunda VEGF ekspresyonu düzeyleri.



Şekil 2: Kontrol grubu ve Diyabet grubu testis dokusunda Bcl-2 ekspresyonu düzeyleri.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, STZ indüklemesi ile oluşturulmuş olan deneysel diyabet sonucunda testis dokusunda spermatik hücrelerin bazılarında dejenerasyon, çekirdekte küçülme ve yer yer piknosis olduğunu gözlemledik. Diyabetin Sertoli hücrelerinde yapısal değişikliklere, tubuller arasındaki damarlarda dilatasyona ve hemorajiye neden olduğu saptandı. Ayrıca diyabet sonucu testis dokusunda VEGF ekspresyonunun neredeyse bloke olduğu, Bcl-2 ekspresyon düzeyinin ise diyabetik grubun testis dokularında kontrol grubuna kıyasla azalma gösterdiğini hem immünohistokimya hemde Western Blot yöntemleriyle gösterdik. Diyabetin sıçanlarda androjen reseptörlerinin azalmasına, hormon sentezinde ve seksüel fonksiyonlarda bozukluklara ve bununla birlikte, sperm sayısında, hareketliliğinde ve kalitesinde, ayrıca testis ağırlığında azalma gibi anormalliklere neden olduğu bilinmektedir [16]. Ayrıca, diyabetin gonadal fonksiyonları etkileyerek testesteron düzeyinin azalmasına, testiküler disfonksiyon ve yetersiz spermatogeneze neden olduğu rapor edilmiştir [17]. Diyabetli sıçanların testis dokusunda meydana gelen değişiklikler seminifer tübülde atrofi, tübül duvarında hiyalinizasyon, Sertoli hücre vakuolizasyonu ve interstisyel alanda kollajen artışı ve Leydig hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel bozuklukları kapsamaktadır [18-20].

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak spermatik hücrelerin bazılarında dejenerasyon çekirdekte küçülme ve yer yer piknosis gözlenirken, Sertoli ve Leydig hücrelerinde yapısal değişiklikler olduğu saptandı. Ayrıca tubuller arasındaki damarlarda dilatasyon ve hemoraji gözlemlendi. Bu sonuçlar diyabetin testis dokusunda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olduğunu ve infertilitede önemli bir rolünün olduğunu ifade etmektedir.

Anjiogenik faktör olan VEGF ve VEGF reseptörleri hem Sertoli hemde Leydig hücrelerinde üretilmektedir [21]. VEGF' nin spermatogonial çoğalmayı indüklediği ve germ hücrelerinin homeostazisi için önemli olduğu belirtilmiştir [22]. Ayrıca VEGF' nin mikrovasküler geçirgenliği uyardığı ve Sertoli hücrelerinde sıkı kavşaklar sayesinde spermatogonia geçişini etkilediği belirtilmiştir [23]. Yapılan bir çalışmada diyabetik sıçanlarda testiküler VEGF miktarının azaldığı ve VEGF düzeyindeki azalmanın apoptozisdeki artış ve testiküler hasar ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir [24]. Çalışmamızda literatürle uyumlu bir şekilde VEGF ekspresyonunun DM grubunun testis dokularında kontrol grubuna kıyasla neredeyse saptanamayacak düzeyde azaldığını gözlemledik. Bu sonuçlar, diyabet sonucu gelişen VEGF ekspresyonundaki azalmanın endotel geçirgenlikte azalmaya ve yetersiz anjiogeneze neden olabileceği ve bunun sonucunda vasküler bozuklukların oluşabileceğini önermektedir.

Hiperglisemi apoptozisi indükleyerek reproduktif sistem de dahil bir çok organ ve sistemde hasara neden olmaktadır [25]. Hiperglisemi sonucu oluşan oksidatif stresin apoptozisin başlamasında majör bir rol oynadığı rapor edilmiştir [26,27]. DM apoptozis yolağında yer alan Bcl-2/Bax/Caspas-9 gibi sinyal moleküllerini regüle ederek apoptozisi indüklemektedir. Yapılan bir çalışmada diyabetli ratların testis dokusunda anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunda artış gözlemlendiği, buna karşın pro-apoptotik protein olan Bax ekspresyonunda ise azalma

olduğu açıklanmıştır. Başka bir çalışmada hipergliseminin indüklediği apoptozisin caspas-3 yolağının aktivasyonu ile regüle edildiği gösterilmiştir [28]. Benzer şekilde, diyabetik ratların kalp dokusunda apoptotik hücre sayısındaki artışla birlikte, caspas-9, 8 ve 3 aktivasyonunda artış ve Bcl-2 ekspresyonunda azalış olduğu rapor edilmiştir [29]. Çalışmamızda literatürle uyumlu bir şekilde diyabetik ratların testis dokusunda anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun da kontrole oranla azalma olduğunu tespit ettik. Hücrede apoptozis mitokondrial apoptozis yolağı veya ölüm reseptörleri apoptozis yolağı tarafından regüle edilir. Sonuçlarımız literatürdeki çalışmalarında destekleyerek diyabetin indüklediği testiküler apoptozisdeki ana yolağın Bcl-2 bağımlı mitokondrial apoptozis yolağı olduğunu ifade etmektedir.

Sonuç olarak; VEGF ve Bcl-2 miktarının diyabetik ratların testis dokusunda pozitif korele bir şekilde azalma göstermesinin her iki proteinin diyabet patofizyolojisinde hücre proliferasyonu, apoptozis ve anjiogenezde birlikte rol aldığını işaret etmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007;44:127-53.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31:55-60.
3. Zorlu M, Helvacı A, Kıskaç M, et al. Silent myocardial ischemia and related risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Dicle Med J* 2010;37:140-4.
4. Cai L, Chen SL, Evans T, et al. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Uro Res* 2000;28:342-7.

5. Shrilatha B. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Repro Toxicol* 2007; 23: 578-587.
6. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007;22:1871-7.
7. Kehler DS, Stammers AN, Susser SE, et al. Cardiovascular complications of type 2 diabetes in youth. *Biochem Cell Biol* 2014;7:1-15.
8. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
9. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
10. Caires KC, de Avila J, McLean DJ. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction* 2009;138:667-77.
11. M Kanter, C Aktas, M. Erboğa. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:1578-85.
12. Rashid K, Sil PC. Curcumin ameliorates testicular damage in diabetic rats by suppressing cellular stress-mediated mitochondria and endoplasmic reticulum-dependent apoptotic death. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:70-82.
13. Jang JH, Surh YJ: Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1371-9.
14. Masiello P, Broca C, Gross R, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 1998;47:224-9.
15. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-46.
16. Lin SH, Wang ZS. Study on the expression of androgen receptor in testis, Epididymis and prostate of adult rats with diabetes. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005;11:891-4.
17. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *T Klin J Med Sci* 2002;22:173-8.
18. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec* 1985;213:53-62.
19. Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:1-11.
20. Anderson JE, Thliveris JA. Morphometry and cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat* 1987;180:41-8.
21. Ebisch IMW, Thomas CMG, Wetzels AMM, et al. Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil Steril* 2008;90:2340-50.
22. Reddy N, Kasukurthi KB, Mahla RS, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) transcript and protein in the testis of several vertebrates, including endangered species. *Theriogenology* 2012;77:608-14.
23. Yoshida A, Anand-Apte B, Zetter BR. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor

- and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 1996;13:57-64.
24. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, et al. Potential Novel Biomarkers for Diabetic Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Nerve Growth Factor Beta and Vascular Endothelial Growth Factor. *Disease marker*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/108106>.
25. Adler A. Obesity and target organ damage: diabetes. *Int J Obes* 2002;26:11-14.
26. Waisundara VY, Hsu A, Huang D, Tan BKH. *Scutellaria baicalensis*: enhances the anti-diabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Am J Chinese Med* 2008;36:517-40.
27. Long L, Wang J, Lu X, et al. Protective Effects of Scutellarin on Type II Diabetes Mellitus-Induced Testicular Damages Related to Reactive Oxygen Species/Bcl-2/Bax and Reactive Oxygen Species/Microcirculation/Staving Pathway in Diabetic Rat. *J Diabetes Res* Volume 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/252530>
28. Cai L, Li W, Wang G, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C- mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 2002;51:1938-48.
29. Amin AH, El-Missiry MA, Othman AI. Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis. *Eur J pharmacol* 2015;747:166-73.