



**DENEYSEL DİYABET MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA OMEGA-3'ÜN
TESTİS DOKUSUNA ETKİLERİ**

**Eda Nur ÖZSOY
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. Mehmet GÜL
Yüksek Lisans Tezi – 2024**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL DİYABET MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
OMEGA-3'ÜN TESTİS DOKUSUNA ETKİLERİ**

Eda Nur ÖZSOY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet GÜL**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2022/3143 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2024**

KABUL ONAY SAYFASI



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Mehmet GÜL” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “DeneySEL Diyabet Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Omega-3’ün Testis Dokusuna Etkileri” başlıklı **Yüksek Lisans** tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 16/08/2024

Eda Nur ÖZSOY

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	3
2.1.1. Testis.....	3
Testis Gelişimi	3
Testis Anatomisi.....	4
Testis Histolojisi.....	4
Seminifer Tübüller	5
Sertoli Hücreleri.....	5
Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenez.....	6
Sperm Yapısı.....	8
2.2. Diabetes Mellitus (DM).....	9
2.2.1. Dm'nin Erkek Üreme Sistemine Etkileri.....	11
2.3. Streptozotosin.....	15
2.4. Omega-3.....	17
3. MATERYAL VE METOT	19
3. 1. Deney Hayvanları.....	19
3. 2. Etik Beyan.....	19
3. 3. Deneysel Tasarım ve Kimyasallar.....	19
3. 4. Doku Örneklerinin Alınması.....	20
3. 5. Histolojik İşlemler	20
3. 5. 1. Histolojik Doku Takip Basamakları	21
3. 5. 2. Mayers'in Hematoksilen&Eozin Yöntemi.....	21
3. 5. 3. Periyodik Asit Schiff Boyama Yöntemi	22
3. 5. 4. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi.....	22
3. 6. Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirmeler	23
3. 7. Biyokimyasal Değerlendirmeler.....	25

3. 8. İstatistiksel Analizler	28
4. BULGULAR.....	29
4. 1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Kan-Glukoz Seviyeleri	29
4. 2. Testis Ağırlıkları.....	29
4. 3. Işık Mikroskopik Bulgular	30
4. 4. Histomorfometrik Bulgular	50
4. 5. Histopatolojik Bulgular.....	51
4. 6. İmmünohistokimyasal Bulgular	51
4. 7. Sperm Morfolojisi.....	52
4. 8. Biyokimyasal Bulgular	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	65
EKLER	81

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin tüm aşamalarında, değerli bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen, kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜL'e,

Bilgi birikimleriyle eğitimime destek olan ve tez çalışmamın yürütülmesinde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Nigar VARDI' ya, Prof. Dr. Aslı TAŞLIDERE' ye, Prof. Dr. Elif TAŞLIDERE' ye ve Doç. Dr. Azibe YILDIZ' a,

Biyokimyasal analizler ve çalışmam sırasındaki yardımlarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Erman ERDEMLİ' ye, istatistik analizlerinde yardımcı olan Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ' a,

Tez çalışmam sırasında yapmış oldukları katkılardan dolayı Dr. Öğr. Üyesi Emrah ZAYMAN'a, Doç. Dr. Onural ÖZHAN'a ve Dr. Elif KAYHAN'a

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Rümeyza Hilal DATLI'ya, Dr. Zeynep Büşra KESER'e, Dr. Evrim YALÇIN'a, Dr. Gökçe KOÇA'ya, Dr. Mustafa AKYÜZ'e ve Bio. Leyla YURTSEVEN'e

Her zaman bana destek olan arkadaşlarım Maya AHMADOVA'ya, Dilara BAKMAZ'a, F. Yaren YETER'e

TYL-2022-3143 nolu projeme, maddi katkılarından dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Ayrıca hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan kıymetli annem Göknur ÖZSOY'a, canım babam Kadir ÖZSOY'a ve biricik kardeşim Seda'ya teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Eda Nur ÖZSOY

ÖZET

Deneysel Diyabet Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Omega-3'ün Testis Dokusuna Etkileri

Amaç: Bu çalışmada, STZ ile deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanların testis dokusu üzerinde oluşan hasara karşı, Omega-3'ün muhtemel protektif etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: 28 adet *Wistar Albino* cinsi erkek sıçan, K, DM, DM+O ve O olarak her grupta 7 sıçan olacak şekilde gruplandırıldı. K grubu, *ad libitum* olarak beslendi. DM grubuna, tek doz SF içinde çözünmüş STZ i.p. olarak uygulandı ve enjeksiyonu takiben 4. gün kan-glukoz seviyeleri kontrol edilerek kan-glukoz düzeyleri ≥ 200 mg/dl olan sıçanlar DM kabul edildi. DM+O grubundaki sıçanlara STZ ile DM indüklenerek gün aşırı 500 mg/kg ω -3 verildi. O grubuna ise 500 mg/kg ω -3 verildi. 42 günlük deney sonunda sıçanlardan anestezi altında intrakardiyak kan ve testis doku örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Testis dokuları, histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendi.

Bulgular: K ve O gruplarının seminifer tübülleri normal histolojik yapı sergiledi. DM grubunda, bazal sınırları düzensiz seminifer epitelde yer yer dökülme, nekroz, interstisyel alanda vasküler konjesyon ve belirgin ödem gözlemlendi. ω -3, DM'nin sebep olduğu bu histopatolojik hasarları azalttı. K ve O gruplarında KAS-3 immünreaktivitesi en düşük seviyede, VEGF ve TJP1 ekspresyonları en yüksektir. DM grubunda KAS-3 ekspresyonu fazla, VEGF ve TJP1 immünreaktiviteleri azalmıştır. ω -3'ün bu değerleri tersine regüle ettiği gözlemlendi. DM+O grubunda FSH, LH ve T seviyeleri DM grubundakine göre daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. O grubu, FSH, LH ve T seviyeleri açısından en yüksek değere sahiptir.

Sonuç: Bu çalışma, STZ ile DM indüklenen sıçanlarda, DM'nin sebep olduğu testiküler hasara karşı ω -3'ün iyileştirici ve koruyucu etkileri olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Omega-3, Testis

ABSTRACT

Effects of Omega-3 on Testicular Tissue in Rats with Experimental Diabetes Model

Aim: This study aimed to investigate the possible protective effect of Omega-3 against damage to the testicular tissue of rats in which an experimental diabetes model was induced with STZ.

Material and Method: 28 male Wistar Albino rats were divided into groups K, DM, DM+O and O, with 7 rats in each group. Group K was fed freely, while blood sugar levels were checked by a single dose of STZ in the DM group; those ≥ 200 mg/dl were considered as DM. DM was induced with STZ in the DM+O group and 500 mg/kg ω -3 was given every other day. Group O was given 500 mg/kg ω -3. At the end of the 42-day experiment, blood and testicular tissue samples were taken from the rats; the tissues were examined by histopathological, immunohistochemical and biochemical methods.

Results: Seminiferous tubules of groups K and O had normal histological structure. In the DM group, seminiferous epithelium was shed, necrosis, vascular congestion and significant edema were observed. ω -3 reduced these histopathological damages caused by DM. CAS-3 immunoreactivity was at the lowest level in groups K and O, while VEGF and TJP1 expressions were at the highest level. While CAS-3 increased in the DM group, VEGF and TJP1 decreased; ω -3 regulated these values inversely. FSH, LH and T levels were higher in the DM+O group than in the DM group, and group O had the highest values.

Conclusion: This study showed that ω -3 has healing and protective effects against testicular damage caused by DM in rats induced by STZ.

Keywords: Diabetes, Omega-3, Testis

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
Ad	: Tip A Koyu Spermatogonyum
aER	: Granülsüz Endoplazmik Retikulum
AGE	: Gelişmiş Glikasyon Son Ürün Reseptörü
ALA	: α -Linolenik Asit
AMH	: Anti-Müllerian Hormonu
Ap	: Tip A Açık Spermatogonyum
Apaf-1	: Apoptotik Peptidaz Aktivasyonu Faktörü 1
ARE	: Antioksidan Yanıt Elemanı
ATP	: Adenozin Trifosfat
BTB	: Kan-Testis Bariyeri
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
DAX-1	: Doza Duyarlı Cinsiyetin Tersine Çevrilmesi, Adrenal Hipoplazi Kritik Bölgesi, Kromozom X, Gen 1
DM	: Diabetes Mellitus
DM+O	: Diabetes Mellitus ve Omega-3
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPA	: Dokozaheptaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
FS	: Lifli Kılıf
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
gER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GLUT	: Glukoz Taşıyıcı
GLUT2	: Glukoz Taşıyıcı Tip 2
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H&E	: Hematoksilen ve Eozin

HPG	: Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal Aks
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IHC	: İmmünohistokimya
K	: Kontrol
KAS-3	: Kaspaz-3
LH	: Luteinleştirici Hormon
MDA	: Malondialdehit
MIF	: Müllerian İnhibe Edici Faktör
MNU	: N-Metil-N-Nitrozoüre
MS	: Mitokondriyal Kılıf
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NO	: Nitrik Oksit
NOX	: NADPH Oksidaz
Nrf2	: Nükleer Faktör-Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
O	: Omega-3
ODF	: Dış Yoğun Lifler
OSI	: Oksidatif Stres İndeks
PARP	: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RS	: Radyal Parmaklıklar
SDA	: Stearidonik Asit
SF	: Serum Fizyolojik
SF-1	: Steroidojenik Faktör 1
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOX-9	: Sry-Box Transkripsiyon Faktörü 9
SRY	: Cinsiyet Belirleyici Bölge Y
STZ	: Streptozotosin
T	: Testosteron
TAS	: Total Antioksidan Durum
TCA	: Trikarboksilik Asit
TBA	: Tiyobarbitürik Asit

TDF	: Testis-Belirleyici Faktör
TJP	: Tight Junction
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TOS	: Total Oksidan Durum
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WT-1	: Wilms' Tümörü 1
XO	: Ksantin Oksidaz
ω-3	: Omega-3



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Testis anatomisinin şematik çizimi (18).	4
Şekil 2.2. Sperm yapısının şematik çizimi (21).	9
Şekil 2.3. Diyabet türleri (25).	10
Şekil 2.4. Diyabette üreme hasarına ilişkin HPG'nin düzenlenmesinin şematik diyagramı (47).	13
Şekil 2.5. STZ ve MNU'nun kimyasal formülleri (83).	16
Şekil 2.6. ω -3 PUFA'ların kimyasal yapıları (109).	18
Şekil 4.1. K grubu. Seminifer tübül (St), seminifer tübül epiteli (Se), seminifer tübül lümeni (L), seminifer tübül çapı (Sç), interstisyel bağ dokusu (ok başı). H&E, X10.	31
Şekil 4.2. K grubu. Seminifer tübül epiteli (Se), seminifer tübül lümeni (L), spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), interstisyel doku içinde damar (ok başı). H&E, X20.	31
Şekil 4. 3. K grubu. Spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), Sertoli hücresi (çift başlı ok), interstisyel doku içinde Leydig hücresi (ok başı). H&E, X40.	32
Şekil 4. 4. K grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, X20.	33
Şekil 4. 5. K Grubu. Kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmiyor. (yıldız). IHC, X20.	34
Şekil 4. 6. K grubu. VEGF immünreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	34
Şekil 4. 7. K grubu. TJP immünreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	35
Şekil 4. 8. DM grubu. Seminifer tübül (St) lümeninde immatür seminifer epitel hücre kümeleri (ok), seminifer tübül lümeni (L), interstisyel bağ dokusu alanlarda yaygın ödem (yıldız). H&E, X10.	36
Şekil 4. 9. DM grubu. Seminifer tübül lümeninde farklı gelişim aşamalarında dejeneratif seminifer epitel hücre kümeleri (ok), seminifer tübül lümeninde dejeneratif hücrel birikim ve hyalinizasyon (çift başlı ok), interstisyel bağ dokusu alanlarda ödem (yıldız). H&E, X20.	36
Şekil 4. 10. DM grubu. Seminifer tübül epitel hücrelerinde dökülme ve ayrılma şeklinde hasar (yıldız). H&E, X20.	37

Şekil 4. 11. DM grubu. Seminifer tübül epitel hücrelerinde nekroz (siyah yıldız), Sertoli hücresi (ok), interstisyel bağ dokusu alanlarda ödem (beyaz yıldız). H&E, X40.....	37
Şekil 4. 12. DM grubu. Seminifer tübül bazal membranlarında ayrılma ve ondülasyon şeklinde hasar (ok). PAS, X20.	38
Şekil 4. 13. DM grubu. Kaspaz-3 immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	39
Şekil 4. 14. DM grubu. VEGF immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.....	39
Şekil 4. 15. DM grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	40
Şekil 4. 16. DM+O grubu. Seminifer tübül (St), seminifer tübül lümeni (L), interstisyel bağ dokusu (ok başı). H&E, X10.....	41
Şekil 4. 17. DM+O grubu. Seminifer tübül lümeni (L), spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), interstisyel bağ doku içinde damar (ok başı). H&E, X20.....	41
Şekil 4. 18. DM+O grubu. Spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), Sertoli hücresi (çift başlı ok), interstisyel doku içinde Leydig hücresi (ok başı). H&E, X40.....	42
Şekil 4. 19. DM+O grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, X20.....	43
Şekil 4. 20. DM+O grubu. Kaspaz-3 immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	44
Şekil 4. 21. DM+O grubu. VEGF immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.....	44
Şekil 4. 22. DM+O grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	45
Şekil 4. 23. O grubu. Seminifer tübül (St), seminifer tübül lümeni (L), interstisyel bağ dokusu (ok başı). H&E, X10.	46
Şekil 4. 24. O grubu. Seminifer tübül lümeni (L), spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), interstisyel bağ doku içinde damar (ok başı). H&E, X20.....	46
Şekil 4. 25. O grubu. Spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), Sertoli hücresi (çift başlı ok), interstisyel doku içinde Leydig hücresi (ok başı). H&E, X40.....	47
Şekil 4. 26. O grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, X20.	48
Şekil 4. 27. O grubu. Kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmiyor. (yıldız). IHC, X20.	49
Şekil 4. 28. O grubu. VEGF immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	49
Şekil 4. 29. O grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.	50

Şekil 4. 30. Sperm morfolojisi. A. Normal sperm, B. Başsız sperm, C. Yumru baş, D. İğne baş, E. Çengelsiz baş, F. Çift başlı sperm, G. Amorf baş, H. Bükük boyun, I. Kıvrık kuyruk, J. Kısa kuyruk. Sperm Morphology Kit (FertiPro), X40.....52



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. Bouin solüsyonu (112).....	21
Tablo 3. 2. Doku Takip Basamakları	21
Tablo 3. 3. Mayers'in H&E Yöntemi.....	21
Tablo 3. 4. PAS Boyama Yöntemi	22
Tablo 3. 5. IHC Boyama Yöntemi	22
Tablo 3. 6. Sperm Morfolojisi Analiz Basamakları	25
Tablo 4. 1. Sıçanların Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Vücut Ağırlıkları	29
Tablo 4. 2. Sıçanların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Kan-Glukoz Seviyeleri	29
Tablo 4. 3. Testis Ağırlıkları.....	30
Tablo 4. 4. Histomorfometrik ölçüm sonuçları	50
Tablo 4. 5. Histopatolojik Tübül Değerlendirme.....	51
Tablo 4. 6. İmmünohistokimyasal immünreaktivite düzeyleri.....	51
Tablo 4. 7. Sperm morfolojisi.....	52
Tablo 4.8. Serum hormon seviyelerinin karşılaştırılması.	53
Tablo 4. 9. Oksidan-Antioksidan Biyokimyasal Analiz Bulguları	54

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), modern toplumdaki en yaygın sağlık sorunlarından biridir ve diyabet hastası sayısı her geçen gün artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF; International Diabetes Federation) 2017 verilerine göre, dünyada 451 milyon diyabet hastası bulunduğu, bu sayının ise 2045 yılında 693 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1).

DM, hiperglisemi ile karakterize, kronik bir endokrin bozukluktur. Hiperglisemi, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasını bozarak çeşitli patojenik süreçlere yol açmaktadır. Bu patojenik süreçler, pankreas β -hücrelerinin otoimmün yıkımına sebep olarak insülin eksikliğine yol açmaktadır. İnsülinin hedef dokulara yetersiz etkisi ise vücutta gözler, böbrekler, sinirler, kalp, kan damarları ve ürogenital sistem olmak üzere birçok farklı dokuda hasar ve işlev bozukluğuna sebep olmaktadır. Diyabetin uzun vadeli komplikasyonları arasında potansiyel görme kaybı olan retinopati; böbrek yetmezliğine yol açan nefropati, periferik nöropati ve gastrointestinal, genitoüriner, kardiyovasküler semptomlara ve cinsel işlev bozukluğuna sebep olan otonom nöropati ve artan oksidatif stres yer almaktadır (2, 3).

Hem klinik hem de deneysel çalışmalar, DM'nin erkek infertilitesiyle ilişkili olarak testislerde dejeneratif ve apoptotik değişikliklere (4), spermatogenezde bozulma ile birlikte sperm morfolojisi ve motilitesinde bozulmaya, testosteron (T), LH ve FSH seviyelerinde de azalmaya sebep olduğunu göstermektedir (5). DM'nin erkek infertilitesine etkisine, hipotalamik-hipofiz gonadal eksenindeki (HPG) hormonal değişiklikler veya insülin sentezleme yeteneği olan testis ve sperm hücrelerinde insülin ekspresyonunun azalmasına da sebep olabileceği bildirilmektedir (6).

Omega-3 (ω -3) çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA'lar) olan ilgi, sağlığın geliştirilmesi ve hastalık riskinin azaltılmasındaki çeşitli rolleri nedeniyle son yıllarda artmıştır. ω -3 PUFA'lar, α -linolenik asit (ALA; 18:3 ω -3), stearidonik asit (SDA; 18:4 ω -3), eikosapentaenoik asit (EPA; 20:5 ω -3), dokosapentaenoik asit (DPA; 22:5 ω -3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA; 22:6 ω -3) içermektedir (7). ω -3 yağ asidi türleri çeşitli mekanizmalar üzerinde moleküler düzeyde (8,9) farklı etkilere sahip olabilir. Özellikle ALA, EPA ve DHA, glukoz homeostazı ve insülin duyarlılığı üzerinde düzenleyici etkilerinin olduğu gösterilmiştir (10, 11).

Yağ asitlerinin erkek fertilizasyon potansiyeli üzerindeki olumlu etkileri çeşitli

Çalışmalarda gösterilmiştir (12). Metabolizmaları sırasında uygun yağ asitleri desatraz enzimlerini oluşturamayan canlılar, diyetlerinde bol miktarda ω -3 yağ asidine ihtiyaç duymaktadır (13). Diyetle alınan yeterli miktardaki ω -3'n, DM'nin birçok doku ve organdaki olumsuz etkilerini azalttığı veya düzelttiği gösterilmiştir. ω -3, kan glukoz seviyelerinin düşmesini, insülin geninin ekspresyonunun artmasını sağlayarak (14); erkek üreme sisteminde, DM' ye bağlı gelişen seminifer tübüllerdeki spermatogenez endekslerinin iyileşmesine, tübüler atrofisinin azalmasına ve germ hücrelerinin erken spermatogenez sürecinde ayrışmasının engellenmesine yardımcı olur (5). Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanların testis dokusunda oluşan hasara karşı, ω -3'n potansiyel koruyucu ve onarıcı etkisinin histolojik, histomorfometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle koruyucu ve onarıcı etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sisteminin temel fonksiyonu, erkek gametin (spermatozoon) üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasıdır. Bu sistem aynı zamanda erkek cinsiyet hormonlarının sentezinden ve salgılanmasından da sorumludur. Erkek üreme sistemi, skrotum içinde bulunan bir çift testis, boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır (15).

2.1.1. Testis

Testis Gelişimi

Erkek cinsiyet farklılaşması, gelişimin 6. haftasında Y kromozomunun kısa kolunda bulunan SRY (sex determining region on Y) geninin eksprese edilmesiyle başlamaktadır (16). SRY tarafından kodlanan, Testis-belirleyici faktör (TDF), testislerin ve diğer erkek cinsiyet organlarının oluşumunu başlatan genlerin (WT-1, SOX-9, AMH, SF-1, DAX-1) ekspresyonuna neden olmaktadır (15, 17).

Primordiyal germ hücreleri, ara mezodermden gelişen genital kabartılara göç ederek mezodermal hücrelerin ve çölomik mezotelyum hücrelerinin proliferasyonunu indükler ve "primitif cinsiyet kordonlarının" oluşmasını sağlar. Gelişimin bu evresinde primitif cinsiyet kordonları, primordiyal germ hücrelerinden, pre-Sertoli hücrelerinden ve myoid hücre tabakasından oluşur. Daha sonra bu kordonlar seminifer tübülleri, düz tübülleri ve rete testisi oluşturan "seminifer kordonlara" farklılaşır. Gelişimin erken evresinde, primordiyumdan testis gelişimini stimüle eden testosteronu sentezleyen "Leydig hücreleri", seminifer kordonları ayıran mezenkimden meydana gelir. Testosteron, mezonefrik "Wolff kanallarının" büyümesini ve farklılaşmasını sağlayarak erkek genital sistemin boşaltım kanallarının gelişiminden sorumludur. Bu erken evrede, seminifer kordonlarda gelişen "Sertoli hücreleri", paramezonefrik kanaldaki (Müller kanalı) hücre bölünmesini inhibe ederek dişi üreme organlarının gelişimini inhibe eden "Müllerian-inhibe edici faktörü (MIF)" sentezlemektedir.

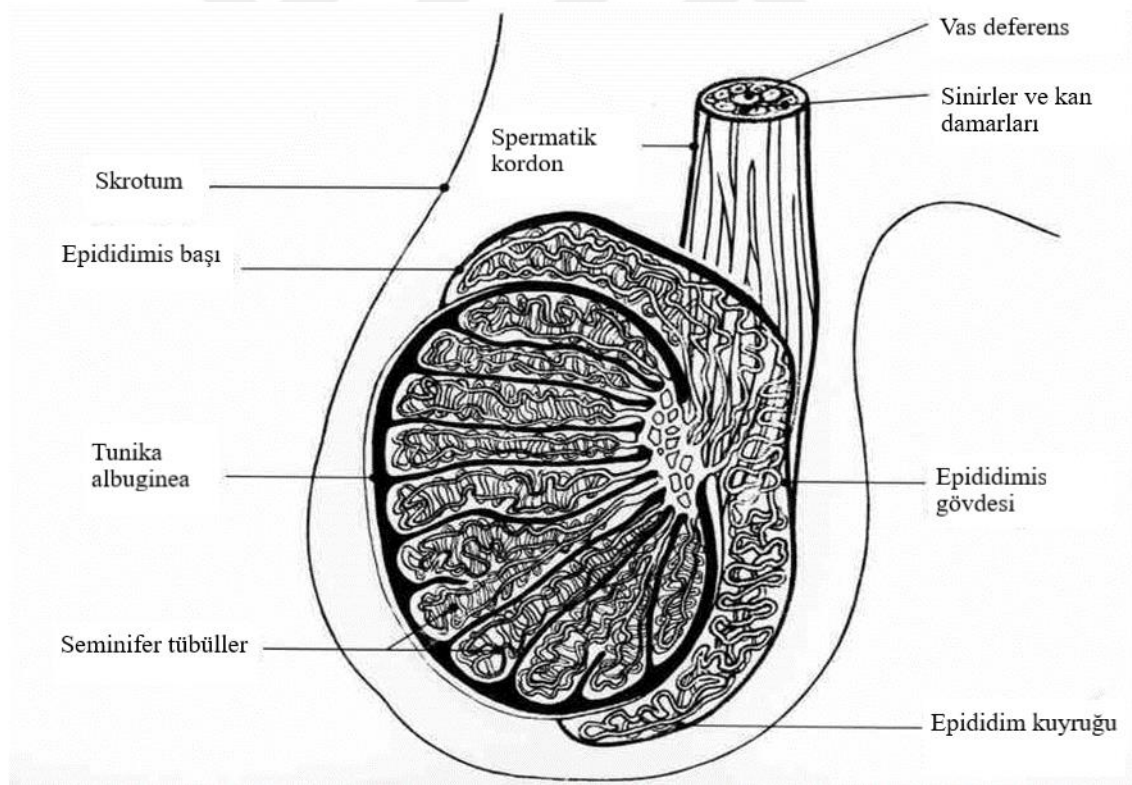
Gelişimin yaklaşık 26. haftasında testisler, karın bölgesinden skrotuma göç ederler. Bu göçe, gelişmekte olan skrotum ile testis arasındaki bağlantıyı sağlayan "gubernakulum" adı verilen ligamentin T etkisiyle kısalması neden olmaktadır. Sonuç

olarak, testisler, skrotum ile abdominal kavite arasında bulunan "inguinal kanaldan" geçerek skrotuma yerleşir (15).

Testis Anatomisi

Testisler, skrotum içinde yer alan bir çift erkek cinsiyet bezidir. Hem endokrin hem de ekzokrin sekresyon yapabilen karma bir bezdir. Skrotumdan palpe edildiğinde testisler pürüzsüz ve yumuşaktır. Spermatik kord, testislerin üst kısmını karın boşluğuna bağlarken; skrotal bağ, gubernakulumun bir kalıntısıdır ve testisleri skrotuma bağlamaktadır. Genelde sol testis sağ testise göre biraz daha aşağıda konumlanmakla beraber sağ testisin ağırlığı sol testise göre yaklaşık %10 daha fazladır.

Testisleri, epididim ve spermatik kordun bağlandığı arka ve üst sınırlardan "tunica vajinalis" sarmaktadır. Tunika vajinalisin visseral tabakası epididim, testis ve vas deferens'e komşudur. Testislerin arka yan yüzeyinde, testisler ile epididim gövdesi arasında epididim sinüsü olarak adlandırılan bir boşluk bulunmaktadır (18).



Şekil 2.1. Testis anatomisinin şematik çizimi (18).

Testis Histolojisi

Testis, dıştan bağ dokusu yapısındaki "tunica albuginea" adı verilen fibröz bir

kapsül ile çevrenmektedir. Tunika albuginea, testisin posterior bölümü boyunca kalınlaşarak "mediastinum testis" yapısını oluşturur. Testiste kan ve lenf damarlarıyla birlikte kanallar da bu yapı içinde seyrederek. Tunika albuginea, testisin içine doğru septalar vererek testisi lobüllere ayırır. Her bir lobül, seminifer tübüllerden ve Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki "stromadan" oluşur. Lobül içinde bulunan her bir tübül kendi üzerinde katlanarak mediastinumda kısa ve düz bir seyir izler ve önce "tübüli rekti", daha sonra ise anastomozlaşan bir kanal sistemi olan "rete testis" ile devam eder (15). Rete testis, testis hilumunda bulunan ve seminifer tübüllerden salgılanan spermleri epididimin efferent kanallarına taşıma işlevi gören bir tübül ağdır (19).

Seminifer Tübüller

Testiste, sperm üretimi seminifer tübüllerde gerçekleşir. Seminifer tübüller, "tunica propriya" adı verilen fibroblast içermeyen çok tabakalı bir bağ dokusu ile çevrelenen "seminifer epitelden" oluşur. Peritübüler doku olarak da bilinen seminifer tübüllerin tunika propriyası, bazal laminanın bazal zarını oluşturur ve hücresel elemanları çevreleme işlevi görür. Tunika propriya, seminifer epitelin bazal laminasının dışında myoid hücreler ve kollajen fibriller içeren bir bağ dokusu yapısındadır (15). Bu miyofibroblastlar, hareketsiz spermatozoanın testisin hilusuna, rete testise taşınmasına izin vermek için seminifer tübüllerin peristaltik kasılmasında önemli bir rol oynar (19).

İntertübüler boşlukta bulunan Leydig hücreleri, temel erkek üreme hormonlarından biri olan testosteronu sentezler ve salgırlar. T, hipofiz testis eksenini aktive ettiği için erkek üremesi için hayati öneme sahiptir. Erkek üreme organlarının gelişimi, olgunlaşması ve ikincil cinsiyet özelliklerinin oluşumu için çok önemlidir. T, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Hormon üretimi Leydig hücrelerinin sayısı ile ilişkili değildir. İmmünohistokimyasal araştırmalar, artan sayılarına rağmen sadece birkaç Leydig hücresinde T oluşumunun gerçekleştiğini kanıtlamıştır (19).

Seminifer epitel, "kan-testis bariyerini (BTB)" de oluşturan "sertoli hücreleri" ve düzenli olarak çoğalan "spermatogenik seri hücreler" olmak üzere iki hücre popülasyonundan oluşur (15, 19).

Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, seminifer epiteli döşeyen poligonal şekilli hücrelerdir.

Gelişmekte olan spermler mayoz bölünmeden sonra sertoli hücrelerine tutunurlar. Sertoli hücreleri aktif hücrelerdir. Şekil ve yerleşimi değişkenlik gösteren ökromatik nükleus, yaygın bir aER, gelişmiş bir gER ve Golgi aygıtı, yassı ve küre şekilli mitokondriyonları, mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan iyi gelişmiş bir hücre iskeletine sahiptirler. Spermatogenik hücreler Sertoli hücrelerinin uzantıları tarafından çevrelenir. Böylece birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmış olan spermatogenik seri hücrelerinin desteklenmesi, korunması ve beslenmesi Sertoli hücreleri tarafından sağlanmaktadır. Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı hücre bağlantılarıyla bağlanır ve bu sıkı bağlantıların özel bölgeleri BTB'yi oluşturur. BTB sayesinde spermatogenik hücreler ile dolaşım sistemi arasında metabolik substratlar ve atık maddelerin değişimi sağlanır ve en önemlisi, BTB, genetik olarak farklı olan haploid germ hücrelerini immün sistemden korur. Sertoli hücrelerinin diğer fonksiyonları ise olgun spermatidleri tübüler lümene ulaştırmak, endokrin ve parakrin maddeler üreterek spermatogenezi düzenlemek, testosteron kontrolü altında "androjen bağlayıcı protein (ABP)" salgılayarak seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Sertoli hücreleri aynı zamanda, spermiyogenezin sonunda oluşan rezidüel artıkları da fagosit eder (15, 19).

Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenez

Spermatogenik hücreler, komşu Sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen, düzenli olarak çoğalıp olgun sperme farklılaşan hücrelerdir. En immatür spermatogenik hücreler olan spermatogonyumlar bazal laminanın üzerinde uzanırlarken en matür hücreler olan spermatidler Sertoli hücrelerinin apikal bölümüne tutunurlar ve tübülün lümenal sınırında yerleşirler (15).

Spermatogenez, sperm hücresi üretiminin meydana geldiği süreçtir. Adenohipofizden salgılanan Luteinleştirici hormon (LH) ve foliküler stimüle edici hormon (FSH) kontrolü altında gerçekleşen karmaşık bir süreç olan spermatogenez üç aşamada gerçekleşir. İlk adım, spermatogonyumun çoğalmasını sağlayan mitotik hücre bölünmeleridir. İkinci adım, diploid hücrelerin haploid hücreler oluşturduğu mayoz bölünmedir ve bu aşama yuvarlak (ikincil) spermatid oluşumuna kadar devam etmektedir. Spermatogenezin son aşaması ise "spermiyogenez" adı verilen yuvarlak spermatidlerden olgun ve hareketli sperm hücreleri olan spermatozoa oluşumunun gerçekleştiği süreçtir. Bu üç aşamanın herhangi birinde gerçekleşecek bir hata, tüm sürecin başarısız olmasına neden olabilecek fonksiyonel anormalliklere sebep olabilir. Bu anormallikler kusurlu

veya azalmış sperm üretimine yol açabilir ve daha şiddetli durumlarda ise spermatozoanın tamamen yokluğuna sebep olarak infertiliteye yol açabilir (19).

I- Mitoz: Primodiyal germ hücreleri, mitoz bölünme ile çoğalarak spermatogonyumları oluşturmaktadır. Heterokromatinin varlığına ve dağılımına göre tip A koyu (Ad), tip A açık (Ap) ve tip B spermatogonyum olarak üç çeşit spermatogonyum tanımlanmaktadır (20).

II- Mayoz: B-spermatogonyum mitozla bölünerek primer spermatositleri ($2n$) oluşturur, bu hücreler mayotik profazın başlangıcını temsil etmektedir. B-spermatogonyumlar seminifer tübülün bazalinden lümenine doğru Sertoli hücrelerinin arasından geçerek ilerlerler. Bu geçiş sırasında hücreler arası bağlantı komplekslerinin hücre göçüne izin verecek şekilde yeniden düzenlenmesi sayesinde BTB korunmaktadır (20). Primer spermatositler I. mayoz bölünmeyi tamamlayarak kısa yaşam süresine sahip olan "sekonder spermatositleri" (n) oluştururlar. Sekonder spermatositler de II. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak "genç spermatidleri" (n) oluştururlar. Mayoz bölünme BTB'nin adluminal kompartmanında gerçekleştiği için yeni oluşan germ hücreleri vücudun immün reaksiyonlarından korunmaktadır (15).

III- Spermiyogenez: Spermatidlerin yeniden şekillenerek "spermatozoa"ya (olgun sperm) dönüşmesidir. Spermiyogenez 4 aşamada gerçekleşir.

a. Golgi Fazı: Golgi kompleksi, spermiyogenezin erken aşamalarında çok önemli rol oynar. Gelişen spermatidin ventral kutbunda Golgi kompleksi içinde PAS+ "proakrozomal granüller" belirirler ve bu granüller birleşerek "akrozomal vezikül" oluştururlar. Akrozomal vezikülün ters kutbunda ise sentrioller bir araya gelerek sperm kuyruğunun aksonemini oluştururlar (15, 20).

b. Kep Fazı: Akrozomal vezikülün, nükleusun ön yarısında yayılarak yeniden şekillenmiş bir yapı oluşturduğu fazdır. Bu yeniden şekillenmiş yapı "akrozomal kep" olarak adlandırılır (15).

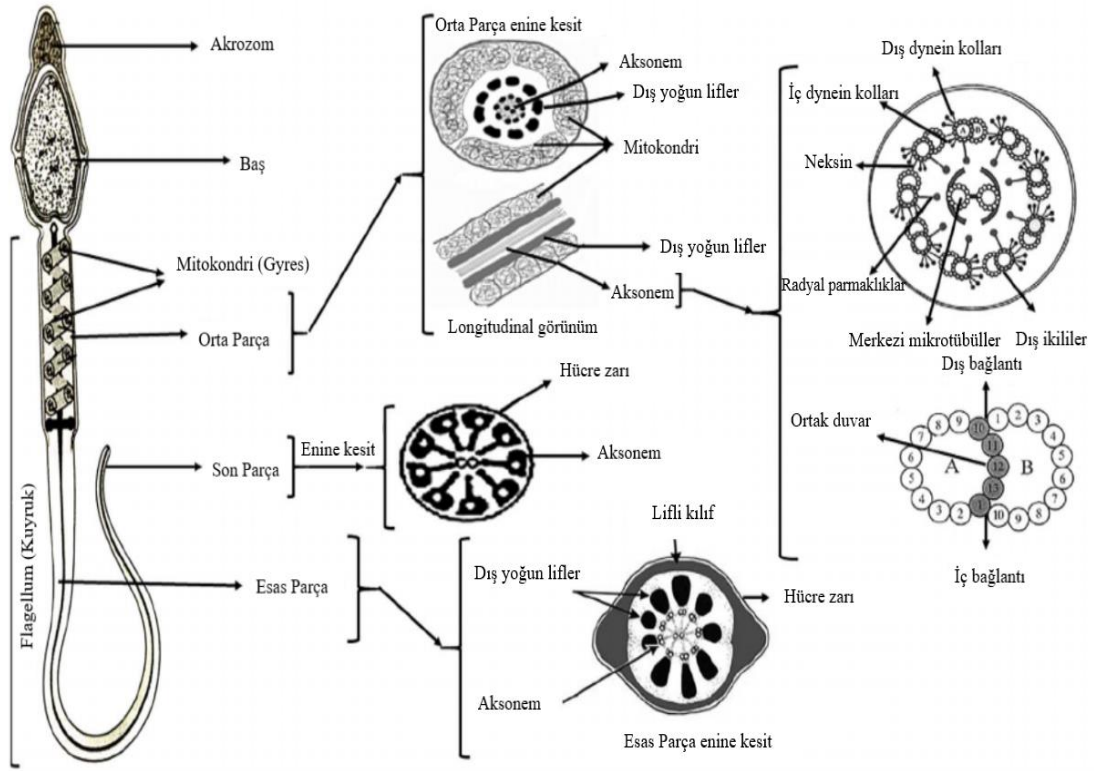
c. Akrozom Fazı: Spermatid hücrelerinin dönüş hareketi yaparak hücre nükleusun seminifer epitelin bazal kısmına, kuyruğun ise apikale bakacak şekilde yön değişikliği yaptığı fazdır. Kondanse olan nükleus yassılaşıp akrozomla birlikte bazale kayar ve hücre zarına yaslanır. Sitoplazmanın artık kısmı ise kuyruğa doğru kayar ve sitoplazmik mikrotübüller manşet yapısını oluşturur. Spermatidlerin başı Sertoli hücresi içine gömülürken gelişen kuyruk seminifer epitel lümenine uzanır. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal parçasını çevreleyerek spermin orta parçasında konumlanırlar (15, 20).

d. Maturasyon (Olgunlaşma) Fazı: Nükleus yoğunlaşmaya devam eder ve

akrozom, tepede çıkıntı yapan kuyruğa bağlı kısım dışında neredeyse tüm nükleusu saran ince bir yapıya dönüşür ve PAS+ boyanır (20). Kuyruğun etrafındaki "rezidüel cisimcik" olarak adlandırılan fazla sitoplazma atılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Böylece olgun spermatozoa oluşur ve Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salınırlar (15).

Sperm Yapısı

Sperm temel olarak, baş ve "flagellum (kuyruk)" olarak 2 temel bölümden oluşmaktadır. Sperm başı, nükleusun ventralinin üçte ikisini saran akrozomal enzimleri (hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin) içeren akrozomal kepten oluşmaktadır. Bu enzimler sayesinde, sperm zona pellusidayı geçerek ovuma penetre olur (15). Flagellum, işlevinde yer alan 1000'den fazla protein içeren karmaşık bir yapıya sahip özel bir silyum şeklindedir. Baş, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölümden oluşur. Flagellum, son parçası dışında, "periaksonemal yapılar" olarak bilinen yapılarla tüm uzunluğu boyunca sarılıdır. Son parça, yalnızca plazma zarı ile çevrili aksoneme sahiptir. Mikroskopik olarak aksonem, "radyal parmaklıklar (RS'ler)" ve "dynein kolları" ile bağlantılı dokuz dış ikili mikrotübül ve bir merkezi ikiliden (9 + 2) oluşan mikrotübül tabanlı bir yapıdır. Dynein kolları, flagellumun hareketinden sorumludur. Orta parçadaki peri-aksonmal yapılar, sarmal bir düzende düzenlenmiş, girdaplar olarak bilinen, sayıları türlere göre değişen, bir mitokondriyal kılıftan (MS) oluşur. Orta parçadaki bir başka peri-aksonmal yapı, "dış yoğun liflerdir (ODF)". Bu ODF'ler, farklı türlerde bağlantı parçasından başlayıp kuyruğun farklı noktalarında biten dokuz sütundan oluşmaktadır. Her lif başlangıçta en büyük halindedir ve esas parça üzerinde farklı noktalarda sona ererek aşağı doğru inceler. Bu ODF'lerin temel işlevi, sperm kuyruğunu epididimden taşınması sırasında ve ejakülasyon sırasında kesme kuvvetinin neden olduğu hasarlardan korumaktır. Aynı zamanda sperm hareketliliği ve kapasitasyonunda da önemli bir rolleri vardır. Esas parça, çevresel sütunlarla birbirine bağlanan iki uzunlamasına kolondan oluşan "lifli kılıf (FS)" ile çevrilidir. Bu uzunlamasına sütunlar, farklı türlerde farklı şekil ve boyutlar sergiler ve esas parçanın ön kısmında en kalındır ve kademeli olarak inceler. FS'nin ana işlevi, glikoliz, siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı sinyal iletimi ve desteği sürecine katkıda bulunan proteinler için bir çerçeve görevi görmektir (21).



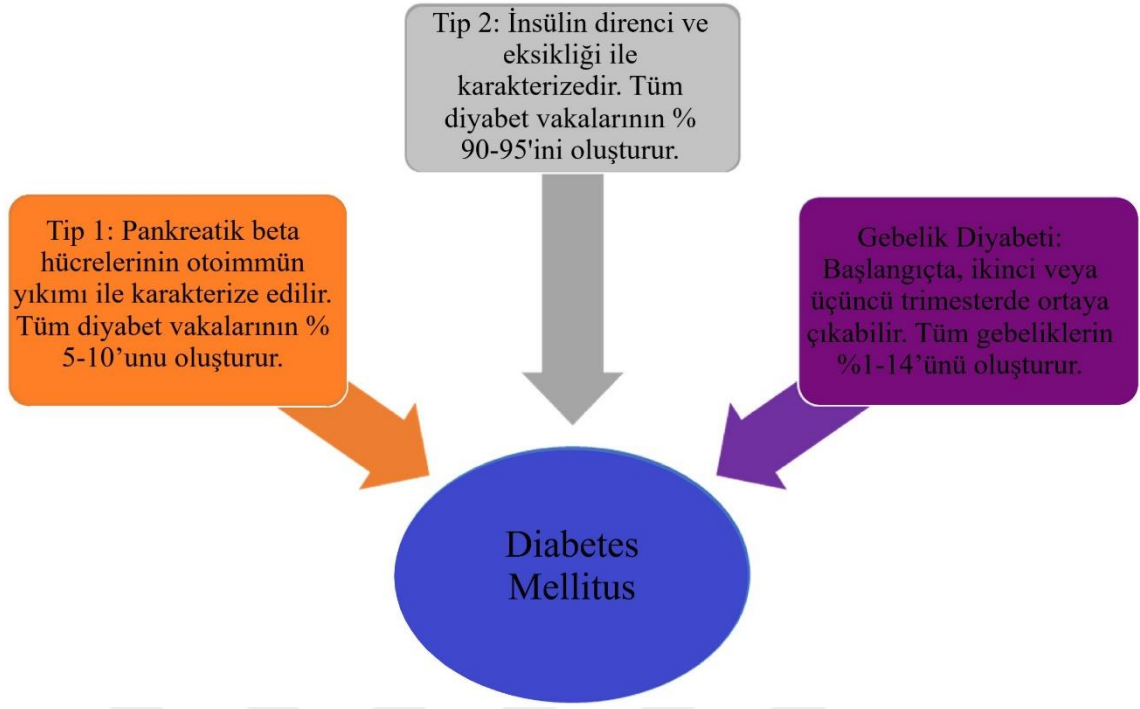
Şekil 2.2. Sperm yapısının şematik çizimi (21).

2.2. Diabetes Mellitus (DM)

"Diabetes Mellitus (DM)", insülin sekresyonunda, insülin etkisinde veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır (22). "İnsülin", pankreasın "Langerhans adacıklarının beta hücreleri" tarafından salgılanan bir polipeptit hormondur ve işlevleri kandaki glikoz seviyelerinin düzenlenmesi, glikozun asimilasyonu ve kullanılmasıdır (23).

DM'de, insülinin hedef dokulara yetersiz etkisi sonucunda karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklere neden olmaktadır (24). Diyabetli bir hastada "insülin direnci" vardır. Vücut hücreleri "insülin" hormonuna karşı direnç gösterdiğinde ortaya çıkar, bu da insüline karşı bir yanıt vermeyi engeller. İnsülinin biyokimyasal etkilerine ve insülin aracılı glikoz atılımına karşı duyarlılığın azalması, insülin direnci olarak bilinir. Bu, kan dolaşımında glikoz birikmesine ve sonuç olarak tip 2 diyabete yol açmaktadır (23).

Diyabetin ortaya çıkmasının çeşitli nedenleri vardır ve diyabetin nasıl yönetileceği, türüne bağlıdır. Diyabetin "tip 1", "tip 2" ve "gebelik diyabeti" olmak üzere üç temel türü vardır (25).



Şekil 2.3. Diyabet türleri (25).

I- Tip 1 Diyabet: Tip 1 diyabet, insülin yetersizliği ve bunun sonucunda ortaya çıkan hiperglisemi ile belirginleşen kalıcı bir otoimmün hastalıktır (26). Pankreastaki otoimmün β -hücre hasarından kaynaklanmaktadır ve bu da toplam insülin eksikliğine yol açmaktadır. Tip 1 diyabet, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları, görme kaybı ve felç gibi ciddi komplikasyonlara sebep olmaktadır. Tip 1 diyabetin genel tedavisi, "ekzojenik insülin ikame tedavisidir" (27).

II- Tip 2 Diyabet: Pankreas β -hücreleri tarafından yetersiz insülin salgılanması ve dokuların insüline düzgün yanıt verememesi olmak üzere iki ana özelliğin birleşiminden kaynaklanan yaygın bir metabolik bozukluktur (28). Bu bozukluğun risk faktörleri arasında yüksek kan şekeri düzeyleri, obezite, hipertrigliseridemi, sağlıklı beslenme alışkanlıkları, egzersiz eksikliği, yaşlanma, aile öyküsü, stres, anksiyete ve depresyon yer almaktadır (29). Tip 2 diyabetin tedavisi için metformin ve diğer glikoz düşürücü ajanlarla birlikte insülin tedavisi gerekmektedir (30).

III- Gebelik Diyabeti: Hamile bir kadının kan şekerinin artması veya yüksek olması durumudur. Hem anneye hem de bebeğe zarar verebilir ve yalnızca bazı kadınlarda hamilelik sırasında ortaya çıkmaktadır. Obezite, ailede diyabet öyküsü ve anne yaşı gibi çok sayıda değişken gebelik diyabetine sebep olabilir. İskemik kalp hastalığı ve tip 2 diyabetle bağlantılıdır (31). Gebelik diyabeti tanısı, genellikle gebelik döneminden önce diyabet öyküsü olmayan hastalarda gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde

konmaktadır ve en tipik gebelik problemidir (32) Bu bozukluk, insülin tedavisi ve beslenme tedavisini de içeren yaşam tarzı değişikliği olmak üzere iki strateji kullanılarak yönetilebilir (33).

DM'nin patofizyolojisi, vücudun insülin düzeyine ve kullanımına bağlıdır. Tip 1 diyabette insülin yoktur, tip 2 diyabette ise periferik dokular insülinin etkisine direnç gösterir. Pankreatik beta hücreleri, artan kan şekeri seviyelerine tepki olarak insülin salgılar; bu da düzgün çalışması için yüksek miktarda kan şekeri seviyelerine ihtiyaç duyan bir organ olan beyne yarar sağlamaktadır (34, 35). Aynı zamanda, merkezi sinir sistemi, glikozun plazma konsantrasyonu tarafından kullanılmak üzere enerji yakıtını serbest bırakması için uyarılır. Düşük kan şekeri seviyeleri otonomik aktivitede artışa neden olur. Düşük kan şekeri seviyeleri veya hipoglisemi, teşhise yardımcı olabilecek bir diyabet belirtisidir. Hipoglisemi, insülin sekresyonunun azalması, glukagon ve epinefrin sekresyonunun artması (glukokortikoid hormonları), sempatoadrenal semptomların artması ve en kötü senaryoda zihinsel bozukluk, konvülsiyonlar, felç, senkop ve koma gibi bir dizi reaksiyonu tetiklemektedir. Glikozun intravenöz veya oral yoldan uygulanması, hipoglisemiye tersine çevirmek ve kan şekeri konsantrasyonunu normal seviyelere döndürmek için hızlı bir tedavidir (35).

2.2.1. DM'nin Erkek Üreme Sistemine Etkileri

DM, kadınlara göre erkeklerde daha sık görülür (36). Hiperglisemi, nöropati, nefropati, retinopati, kardiyovasküler hastalık ve erkek iktidarsızlığı diyabetin nedenlerinden bazılarıdır. Günümüzde diyabet hastası erkeklerin büyük bir kısmında infertilite komplikasyonları görülmektedir (37). Diyabet hastası erkeklerde infertilite kadınlara göre daha yaygındır ve bu durum, bir çiftin doğum kontrolü olmadan bir yıl cinsel ilişkiye girmesine rağmen gebelik oluşmaması olarak açıklanmaktadır (38).

Diyabet hastası erkeklerde, epididim ve testislerde histolojik hasar (39), sperm hareketliliğinde azalma, semen hacminde (40), sperm sayısında, hareketliliğinde ve morfolojisinde (39–41) seminifer tübül morfolojisinde bozulma (42) gözlenmektedir. Bunlar, LH, FSH ve testosteron seviyelerindeki düşüş nedeniyle DM'den kaynaklanan erkek cinsel işlev bozukluklarıdır (43–45).

Deneysel diyabetik sıçan modellerinde, testis dokusunun ağırlığının, Leydig hücrelerinin sayısının, seminifer tübüllerin çapının ve germinal epitelyumun yüksekliğinin azaldığını ve aynı zamanda Leydig hücrelerinde yağ damlacıklarının ve vakuollerin sayısının arttığını gösteren bulgular vardır (46).

Diyabetin testis üzerinde hem yapısal hem de fonksiyonel düzeyde kendini gösteren uzun vadeli sonuçları vardır. Azalmış serum endokrin hormon seviyeleri, yüksek oksidatif stres, testislerde apoptotik ve dejeneratif değişiklikler, anormal otofaji, nöropati, vaskülarizasyon, endotel disfonksiyonu ve enerji metabolizması bozuklukları, diyabetle ilişkili üreme fonksiyon bozukluklarında rol oynadığı görünen patojenik faktörlerden bazılarıdır. Bu faktörlerin doğrudan ya da dolaylı olarak üreme sistemi üzerine etkileri olabileceği düşünülmektedir (47).

Artan oksidatif stres ve antioksidan kapasitesindeki değişikliklerin, kronik diyabetin patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (48). Hücrelerde veya dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) fazlalığı, endojen antioksidan savunmayı aştığında ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres, testis disfonksiyonunun ana sebebidir ve sonuç olarak erkek infertilitesine yol açmaktadır (49). Hiperglisemi, sitoplazmaya büyük miktarda süperoksit ve diğer serbest radikalleri salarak mitokondriyal glukoz oksidasyonunu artırır (50). Germ hücreleri, somatik hücrelerden daha az çoklu doymamış yağ asitleri içerdikleri için serbest radikallerin oksidasyonuna karşı daha hassastır (42, 51).

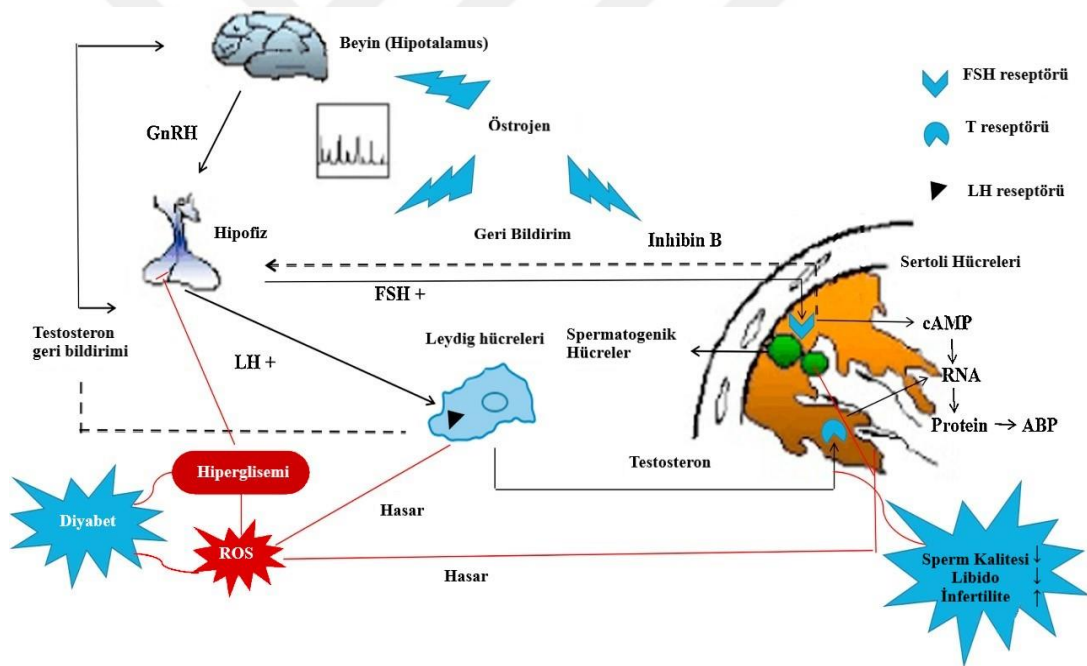
Testislerdeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağı mitokondrideki NADPH oksidazdır (NOX). Hücre içi NADPH'yi oksijene dönüştüren bir elektron akımı üretir ve bu da süperoksit açığa çıkarır (52). NADPH oksidaz aktive edildiğinde diyabetik testis patofizyolojisi üzerinde olumsuz etkileri olması muhtemeldir (53, 54).

Nrf2 (nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2), hücre içi antioksidanların kontrol edilmesi ve oksidatif stresin etkilerinin hafifletilmesi için gereklidir. Diyabet, testisin Nrf2 geninin aşağı regüle edilmesine neden olur ve bu da oksidatif savunma için önemlidir (55). Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT), antioksidan yanıt elemanına (ARE) bağımlı yol aracılığıyla aşırı oksidanları temizleyebilen ve zararlı ROS sentezini durdurabilen enzimler arasındadır (56, 57).

Erkek üreme endokrin sistemi, spermin olgunlaşması ve cinsel fonksiyonun normal kalabilmesi için gereklidir (58). Erkek hormonları hipotalamus tarafından düzenlenir (59). Hipofizde LH ve FSH üretimini hızlı ve titreşimli bir şekilde uyarın portal hipofiz sistemi, hormonal düzenlemenin ana faktörü olan Gonadotropin Salgılayan Hormon (GnRH) üretir (60). LH, T ve FSH hormonlarının düzeyleri üreme sağlığının göstergesi olarak kullanılabilir. İnfertilite, hipofiz bezinin bu endojen hormonları uygun düzeylerde sürdürememesinden kaynaklanabilir ve bu da spermatogenik süreç ve cinsel fonksiyona müdahale edebilir (61, 62).

Erkeklerde yüksek FSH/LH düzeyleriyle birlikte düşük serum T düzeyi, seminifer tübüllerdeki hasar ve libido azalmasıyla ilişkilendirilmektedir. Hipotalamik hipofiz gonadal (HPG) fonksiyon bozukluğunun patofizyolojinin bir parçasıdır. GnRH stimülasyonuna normal veya düşük yanıtın eşlik ettiği düşük bazal FSH ve LH seviyeleri, sağlam GnRH havuzuna ve hedef organların gonadotropinlere ve cinsel hormonlara karşı duyarlılığının artmasına rağmen, diyabetik hayvanlarda bozulmuş hipotalamus-hipofiz fonksiyonunun göstergesidir (63).

Uzun süredir devam eden şiddetli hiperglisemide sistemik metabolik dengesizlik meydana gelir. Bu dengesizlik, HPG eksenini işlevlerini, endokrin sistemin işlevlerini ve Leydig hücrelerinin steroidojenik kapasitesini etkiler (64). Böylece hem klinik hem de laboratuvar araştırmaları, diyabetin serum LH ve FSH düzeylerini azalttığını göstermiştir. Diyabetin spermatogenez ve libido üzerindeki etkileri bu düşüşten kaynaklanmaktadır (65, 66).



Şekil 2.4. Diyabette üreme hasarına ilişkin HPG'nin düzenlenmesinin şematik diyagramı (47).

Testis dokusu ve diğer üreme organlarındaki dejenerasyon ve nekroz, erkek diyabetik üreme sistemi hasarının patojenik faktörleri olan aşırı apoptozdan kaynaklanmaktadır (67). Apoptoz, ökaryotik organizmalarda normal fizyolojik bir süreç olup genetik olarak programlanmış bir hücre ölümüdür (68). Spontan apoptoz süreciyle, normal testis dokusu hasarlı veya anormal germ hücrelerini uzaklaştırarak spermin

miktarını ve kalitesini korumaktadır. Ancak düzensizlik veya aşırı apoptoz, spermatogenik fonksiyon bozukluğu ve infertiliteye neden olmaktadır (40). Tip 1 ve tip 2 diyabetin her ikisi de testislerde germ hücrelerinin kaybına neden olmaktadır (69).

Apoptozun biyokimyasal özellikleri arasında DNA kırılması, fagositik tanıma, kaspaz kaskadı aktivasyonu, protein yapısal konfigürasyonlarının bozulması yer alır. Araştırmalar, apoptotik hücre ölümünün, diyabette organ ve dokularda artan hasar ve üreme başarısızlığının etiyolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (47).

İki ana apoptoz yolu, DM ile ilişkili germ hücresi kaybına aracılık eder: dışsal ölüm reseptörü yolu ve içsel mitokondriyal yol. Bir yolun molekülleri başka bir yolu etkileyebilir. Endojen apoptoz yolu olarak da bilinen mitokondriyal düzenleme, apoptoz araştırmalarının odak noktasıdır. Sitokrom c, mitokondriyal salınımlardan kaynaklanan bir içsel yolla serbest bırakılır. Yüksek ROS seviyeleri iç ve dış mitokondriyal membranları bozar, bu da sitokrom c'nin sitozole salınmasına neden olur; böylece apoptotik proteazla aktive edilen faktör-1 (Apaf-1), prokaspaz-9 ve ATP'den oluşan bir kompleks olan "apoptozom" oluşumunu teşvik eder (70). Apoptozom, prokaspaz-9'un otomatik aktivasyonuna izin verir ve bunu prokaspaz-3'ün aktivasyonu takip eder. Sonuçta kaspaz-3'ün aktivasyonu, germ hücrelerinin DNA merdiveni, kromatin yoğunlaşması ve membran kabarcıklanması yoluyla apoptoza girmesine yol açar (71). Dışsal sinyal yolu, membran reseptörü aracılı etkileşimleri taşıyarak apoptozu başlatır. Dışsal apoptoz yolunun başlatılması, TNF (tümör nekroz faktörü) reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan membran reseptörleri aracılığıyla sinyalleşme yoluyla gerçekleşir. Bu süreç, "ölüm reseptörleri" olarak adlandırılan ve benzer sitokin zengin ekstraselüler alanlara sahip olan TNF reseptör ailesi üyelerini içerir. Bu reseptörler yaklaşık 80 aminoasitten oluşan "ölüm alanı" adı verilen bir sitoplazmik alana sahiptir (72). Bu ölüm alanı, hücre yüzeyinden hücre içi sinyalleşme yollarına ölüm sinyalini ileten kritik bir rol oynamaktadır.

"Otofaji", diyabet gibi metabolizma ile ilişkili hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (73). Testis fonksiyonu otofajiye bağlıdır; eksikliği germ hücresi dejenerasyonuna neden olabilir ve mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) dahil olmak üzere organelleri parçalayıp geri dönüştürerek hücre içi homeostaziyi bozabilir (74). Otofaji, hücre ölümüne yol açan patolojik durumlarda da rol oynamaktadır (75). Hipergliseminin neden olduğu mitokondriyal glukoz oksidasyonundaki artış, sitoplazmaya büyük miktarda süperoksit ve diğer serbest radikallerin salındığını

göstermektedir. Bu nedenle, mitokondride ROS'un aşırı üretimi ve birikmesi germ hücrelerinin ölümüne sebep olarak spermatogenez sürecine müdahale eder (76).

2.3. Streptozotosin

"Streptozotosin (STZ)", toprak bakterisi *Streptomyces achromogenes* tarafından doğal olarak üretilen bir bileşiktir. Bu fungal antibakteriyel ajan, kemoterapide alkilasyon özelliklerine sahip sitotoksik bir glukoz analogudur. Bir nitrozüre bileşiği olarak STZ'nin insanlarda metastatik pankreas adacıkları ve karsinoid tümörlerin tedavisinde olumlu etkileri vardır. STZ'nin diyabetojenik özelliği 1963 yılında bulunmuş ve o tarihten bu yana deneysel hayvan araştırmalarında diyabetin indüklenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ajan, DNA kırılması, kromozomal bozukluk ve DNA sentezi inhibisyonu potansiyeli olan küçük bir molekül olarak kategorize edilir. STZ metabolizasyonu, genom disfonksiyonu sırasında serbest radikaller üretir (77).

STZ'nin ve kimyasal olarak ilişkili alkilleyici bileşiklerin toksik etkisi, bunların hücre içine alınmasını gerektirir. Nitrozüreler tipik olarak lipofiliktir ve plazma membranından hücre içine hızlı bir şekilde girerler; ancak STZ, heksoz ikamesi nedeniyle daha az lipofiliktir. Plazma zarındaki düşük afiniteli GLUT2 glukoz taşıyıcısı aracılığıyla STZ, pankreasın beta hücrelerinde spesifik olarak birikir (78, 79). Bu nedenle, bu glikoz taşıyıcılarının ekspresyonundan yoksun olan insülin üreten hücreler STZ'ye karşı bağışıklık kazanırlar (80). GLUT2 glukoz taşıyıcısının bu süreçteki önemi, STZ'nin bu taşıyıcıyı eksprese eden diğer organlara, özellikle böbrek ve karaciğere zarar vermesidir (81, 82).

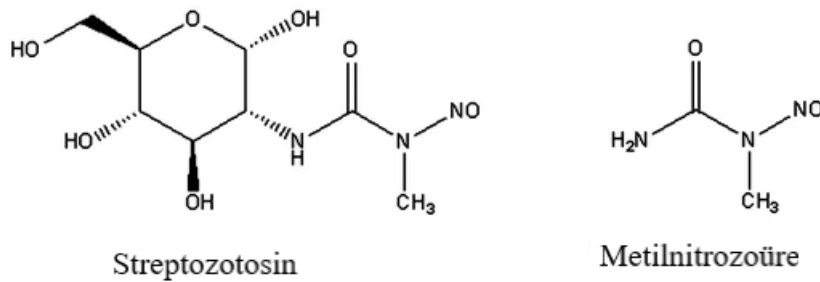
Genel olarak STZ toksisitesinin, özellikle guanin'in O⁶ pozisyonundaki metilnitrozüre kısmının DNA alkilleyici aktivitesine bağlı olduğu varsayılmaktadır (83). DNA parçalanması, metil grubunun STZ'den DNA molekülüne aktarılmasından kaynaklanır ve bu da DNA'ya zarar verir (84) ve bir olaylar zincirini başlatır (84). İlave bir zarar verici faktör de protein glikozilasyonu olabilir (86). Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA'yı onarmak için aşırı uyarılır. Sonuç olarak, daha az hücrel NAD⁺ ve ATP depolanır (85, 87, 88). Beta hücre nekrozu, hücrel enerji depolarının tükenmesiyle sonuçlanır. STZ, proteinleri de metilleştirse de DNA metilasyonu beta hücre ölümüne neden olur. Ancak STZ'ye maruz kaldıktan sonra protein metilasyonunun beta hücrelerinin fonksiyonlarını bozması mümkündür (89, 90).

PARP inhibitörleri, DNA metilasyon sürecini baskılar. Bu nedenle, nikotinamid ve

diğer PARP inhibitörlerinin STZ uygulamasına paralel olarak veya öncesinde enjeksiyonunun, beta hücrelerini STZ'nin toksik etkilerine karşı koruyarak diyabetin gelişmesini önlemektedir (91). Ayrıca PARP eksikliği olan fareler, DNA fragmentasyonuna rağmen STZ'nin aracılık ettiği beta hücre ölümüne karşı dirençlidir. PARP eksikliği, kofaktör NAD⁺'nin tükenmesini önler ve bu da ATP kaybını önler. Sonuç olarak hücre ölümü önlenir (92–95).

O⁶-etilguanin, O⁶-metilguanin'den daha az toksik olması nedeniyle metilleyici eşdeğerlerinden daha az toksik olan etilleyici ajanların kullanılmasıyla, alkilasyonun beta hücre hasarını nasıl etkilediği araştırılmıştır (96). "N-etil-N-nitrozoüre'nin (MNU)" diğer hücre tiplerinde olduğu gibi insülin üreten hücrelerdeki toksik etki mekanizmasının alkilasyona bağlı olduğu, DNA bazlarının metilasyonunun etilasyondan daha toksik olduğu varsayılmaktadır (80, 96) ve etil metansülfonat, insülin üreten hücreler için MNU ve metil metansülfonattan daha az toksiktir (83, 97).

Farklı bir teori ise STZ'nin diyabetojenik etkisinin bir kısmının alkile etme yeteneği ile değil, hücre içi nitrik oksit (NO) donörü olarak hareket etme potansiyeli ile ilgili olabileceğini öne sürmektedir (98). STZ ve MNU nitrozo grubuna sahiptir ve NO'yu serbest bırakabilirler. STZ, guanilil siklaz aktivitesini ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu artırarak NO'nun tipik etkilerini artırmaktadır. En toksik bileşik olan alkilleyici ajan metil metansülfonat, MNU'dan farklı olarak NO donörü değildir, bu da STZ'nin toksik etkisinin gerekli bir koşul olmadığını göstermektedir (96).



Şekil 2.5. STZ ve MNU'nun kimyasal formülleri (83).

Beta hücre fonksiyonlarında toksisitenin neden olduğu bozulmalar, STZ'nin glukoz ve insülin homeostazisi üzerindeki etkilerini göstermektedir. İnsülin sekresyonu, glukoz metabolizması (hem glukoz oksidasyonu hem de oksijen tüketimi) ve insülin biyosentezi birincil öneme sahiptir (99–101). STZ, glikoz taşınması (80) veya glukokinaz yoluyla glikoz fosforilasyonu üzerinde ani veya doğrudan önleyici bir etkiye sahip

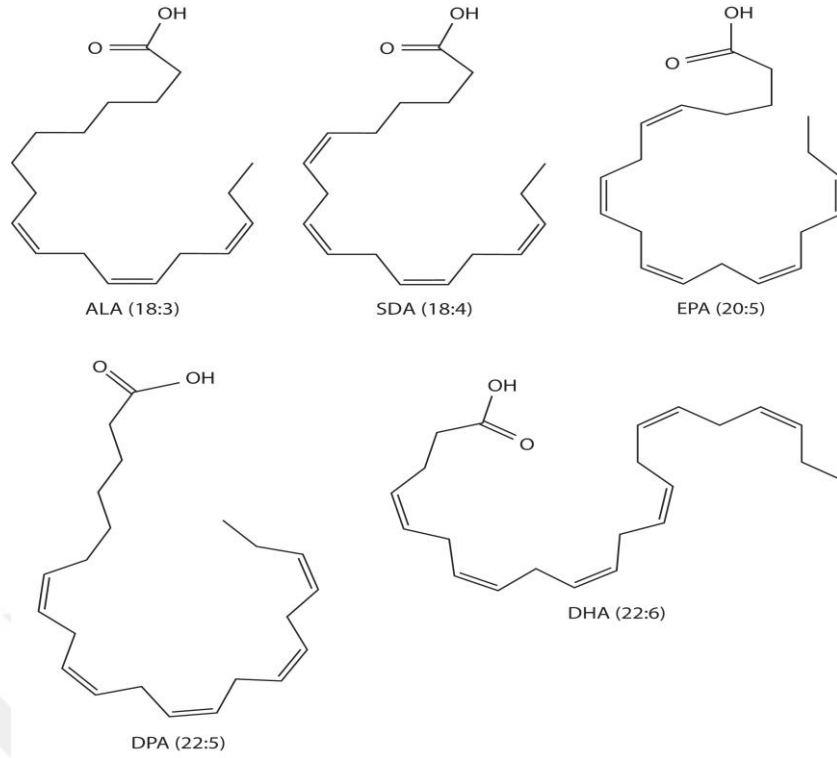
değildir (102). Ancak fonksiyonel beta hücre bozukluğunun ilerleyen aşamalarında gen ekspresyonu ve protein üretimindeki eksiklikler hem glikoz taşınmasının hem de metabolizmanın bozulmasına neden olur (103).

STZ'den kaynaklanan NAD⁺ tükenmesi, insülin biyosentezi ve salgılanmasını durdurabilir. Bu, protein alkilasyonu ve glikozilasyonunun ve mitokondriyal DNA'nın zararlı etkileri daha netleşmeden önce bile gerçekleşebilir (85, 101, 104). Daha sonra, mitokondriyal enzim disfonksiyonunun (105) ve mitokondriyal genomdaki hasarın (106) bir sonucu olarak glikozun indüklediği ve amino asidin indüklediği insülin salgısının inhibisyonu belirgin hale gelir (107). Bu bozulma, besin kaynaklı olmayan insülin sekresyonundan ziyade besin kaynaklı insülin sekresyonunda daha belirgindir. Çalışmalar, izole pankreas adacıklarının PARP inhibitörü nikotinamid ile ön tedavisinin, STZ maruziyetinden sonraki ilk gün boyunca beta hücre fonksiyonunun erken inhibisyonunu önlediğini, uzun süreli STZ maruziyetinden 6 gün sonra insülin sekresyonunun uzun süreli inhibisyonu, nikotinamid tarafından etkisizleştirilmemiştir (108).

2.4. Omega-3

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) tüm insan hücrelerinin temel ve gerekli bileşenleridir. Ayrıca yerel olarak üretilen ve insan üremesinde önemli işlevlere sahip olan eikosanoidler olarak bilinen hormonların yapı taşları olarak da görev yaparlar. ω -3 PUFA'ların sağlığın geliştirilmesinde ve hastalık riskinin azaltılmasında oynadığı birçok rol, son yıllarda PUFA'lara olan ilginin artmasına neden olmuştur. ω -3 PUFA'lar arasında a-linolenik asit (ALA; 18:3 ω -3), stearidonik asit (SDA; 18:4 ω -3), eikosapentaenoik asit (EPA; 20:5 ω -3), dokosapentaenoik asit (DPA; 22:5 ω -3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA; 22:6 ω -3) bulunmaktadır (109).

ω -3 PUFA'lar, kan lipit profillerini ve membran lipit kompozisyonunu değiştirmede önemli bir rol oynar ve eikosanoid biyosentezini, hücre sinyalleme basamaklarını ve gen ekspresyonunu etkilemektedir. Ek olarak, ω -3 PUFA'ların kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, depresyon gibi hastalıklara faydalı etkileri vardır (109).



Şekil 2.6. ω -3 PUFA'ların kimyasal yapıları (109).

Hücre zarlarında bol miktarda bulunan ω -3, ω -3'e ve özellikle DHA'ya bağımlı olan, başta sperm hareketliliği ve canlılığıyla ilgili olmak üzere çok sayıda üreme ile ilgili fizyolojik süreçte yer almaktadır. Sperm zarı akışkanlığı, hareketliliği ve döllenme potansiyeli DHA'daki azalmadan etkilenebilir ve ω -3'ün antioksidan özellikleri de semen kalitesini artırabilir. Ancak insan vücudu bu yağ asitlerini desatüراز enzimi eksikliğinden dolayı sentezleyemez. ω -3'ün ana kaynakları, EPA ve DHA içeren balık yağı, ALA içeren sebzeler ve tohumlar ve ALA'yı ω -3'e dönüştüren memelilerdir (109).

Sperm zarındaki yüksek düzeydeki ω -3 yağ asitleri spermin akışkanlığını artırmaktadır; düşük seviyeler ise sperm-oosit etkileşiminin ve membran füzyonunun bozulmasına yol açarak fertilizasyon potansiyelinin azalmasına neden olur. ω -3, sperm membranının akışkanlığına paralel olarak sperm hareketinin de artmasına neden olur. Böylece sperm parametrelerinin iyileşmesinde önemli bir rol oynar (110).

ω -3 PUFA'lar, farklı etkenlere bağlı toksisitenin sebep olduğu hasarları iyileştirmektedir. ω -3 PUFA'lar, bağırsak mukozal bariyerinde, kan-beyin bariyerinde ve tümör epitelyal ve endotel hücrelerinde çoklu toksik maddeler tarafından bozulan "Tight Junction (TJP)" proteinlerinin regülasyonunu sağlamaktadır. Aynı zamanda, ω -3'ün hasarlı BTB'yi de onardığı için erkek üreme sistemi sağlığında önemli etkileri vardır (111).

3. MATERYAL ve METOT

3. 1. Deney Hayvanları

200-300 gr ağırlığındaki, 12 haftalık, 28 adet *Wistar Albino* erkek sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Sıçanlar, deney boyunca iyi havalandırılmış odada 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüde sabit "oda sıcaklığında" ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) ve "bağıl nemde" (%50-55) barındırıldı. Deney hayvanlarının bakımı ve tüm uygulamaları İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Merkezi'nde, "etik kurul protokolünde" ifade edildiği gibi gerçekleştirildi.

3. 2. Etik Beyan

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden çalışma için etik kurul onayı (Protokol No: 2022/12-2) (HAYBİS NO: 15429) Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alındı. Proje, "İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)" Birimi tarafından "TYL-2022-3143" proje koduyla desteklenmiştir.

3. 3. Deneyel Tasarım ve Kimyasallar

Sıçanlar randomize olarak Kontrol (K), DM, ω -3 (O) ve DM+O olmak üzere her grupta 7 sıçan olacak şekilde gruplandırıldı (deney süresinin uzun olması ve diyabet grubunda ölüm riskinin olması nedeniyle her grupta biyoistatistiksel olarak belirlenen sayıdan 1 adet fazla sıçan kullanıldı). DM indüklenecek sıçanlara serum fizyolojik (SF) içinde çözünmüş STZ tek doz enjeksiyon 50 mg/kg uygulandı ve enjeksiyonu takiben 4. gün kan-glukoz seviyeleri en az iki kat arttığı tespit edilen sıçanlarda DM olduğu kabul edildi ve 42 günlük deney süresi başlatıldı. Sıçanların vücut ağırlıkları ve kan-glukoz seviyeleri, 14 günde bir düzenli olarak ölçüldü.

Kontrol Grubu: Bu grup standart yem ve su ile "*ad libitum*" olarak beslendi.

DM Grubu: SF içerisinde çözünmüş STZ (50 mg/kg) i.p. olarak tek doz uygulandı ve 42 gün boyunca "*ad libitum*" olarak beslendi.

DM+O Grubu: Bu gruba SF içerisinde çözünmüş STZ (50 mg/kg) i.p. olarak tek doz uygulanarak diyabet indüklendi ve 42 gün boyunca 500 mg/kg ω -3 oral olarak verildi.

O Grubu: Bu gruba 42 gün boyunca oral olarak 500 mg/kg ω -3 verildi.

STZ için CAYMAN'ın Streptozotocin 13104-1 ve ω -3 için EFA Liquid (280 mg/ml ω -3; 85 mg/ml EPA; 148 mg/ml DHA) kullanılmıştır.

3. 4. Doku Örneklerinin Alınması

42 günlük deney süresi sonunda sıçanların vücut ağırlıkları ve kan-glukoz değerleri ölçülerek 5 mg/kg ksilazin ile 50 mg/kg ketamin i.p. olarak uygulandı. Sıçanlar, genel anestezi altındayken orta hat insizyonu ile batinları açıldı ve *posterior vena kava*'dan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan serum örnekleri eppendorf tüplere alındı ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 C°'de saklandı. Sıçanların testis dokuları çıkarılıp tartılarak sol testis histolojik analizlerde kullanılmak için Bouin solüsyonuna, sağ testis ise biyokimyasal analizlerde kullanılmak için -80 C°'de muhafaza edildi. Sperm morfolojisi değerlendirmeleri için epididimisin kauda bölümünden sperm örnekleri alındı. Sıçanlar, doku örnekleri alındıktan sonra yüksek doz anestezi ile ötenazi edildi.

3. 5. Histolojik İşlemler

Histopatolojik değerlendirmeler için testis dokuları Bouin solüsyonunda (Tablo 3.1.) fikse edildi. Dokular, 4 saat fikse edildikten sonra trimlenerek plastik doku takip kasetlerine alındı ve Bouin solüsyonu yenilendi. 36 saatlik fiksasyonun ardından dokular, %70'lik alkole daha sonra ise %90'lık alkol serilerinden ve Tissue-Tek VIP/SAKURA marka doku takip cihazında doku takip basamaklarından geçirildi (Tablo 3.2.). Takip işleminden sonra, dokular parafin bloklara gömülerek Leica HistoCore MULTICUT mikrotomla 5 μ m'lik kesitler alındı. Kesitlerden hem histomorfometrik ölçümler yapmak hem de genel histolojik yapıyı incelemek için Hematoksilen-Eozin (H&E) (Tablo 3.3.), bazal membran değişikliklerini incelemek için ise Periyodik Asit Schiff (PAS) (Tablo 3.4.) boyama yöntemleri uygulandı. Ayrıca alınan kesitlerde, Kaspaz-3 (31A1067, Santa Cruz), VEGF (E-AB-40004, Elabscience) ve Tight Junction 1 (TJP1) (E-AB-52081, Elabscience) immünreaktiviteyi belirlemek için Leica BOND-MAX marka immunohistokimya (IHC) boyama cihazı kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapıldı. Boyanan tüm kesitler, "Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, DS-Fi3 camera

(Nikon Instruments Inc., Melville, NY) ve NIS-Elements Documentation 5.02 Görüntü Analiz Sistemi (Nikon Corp., Tokyo, Japan)" kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

3. 5. 1. Histolojik Doku Takip Basamakları

Tablo 3. 1. Bouin solüsyonu (112)

Bouin solüsyonu

Pikrik asit	750 ml
Glasiyal asetik asit	50 ml
Formalin (%37'lik solüsyonu)	Formaldehit 250 ml

Bouin solüsyonunda fikse edilen dokular %70'lik alkol içerisinde alındı ve 48 saat sonunda %70'lik alkol değiştirildi. Toplam 96 saat %70'lik alkol içerisinde bekletildikten sonra %90'lık alkole alınarak doku takibine başlandı (Tablo 3.2.).

Tablo 3. 2. Doku Takip Basamakları

Doku Takip Basamakları

1. % 96'lık alkol	60 dk
2. % 96'lık alkol	60 dk
3. Absolu etil alkol	60 dk
4. Absolu etil alkol	60 dk
5. Ksilen	60 dk
6. Ksilen	60 dk
7. Ksilen	60 dk
8. Parafin	60 dk
9. Parafin	60 dk
10. Parafin	60 dk
11. Parafin	60 dk

3. 5. 2. Mayers'in Hematoksilen&Eozin Yöntemi

Tablo 3. 3. Mayers'in H&E Yöntemi

Mayers'in H&E Yöntemi

1. Deparafinizasyon	60 dk (60°C)
---------------------	--------------

2. Ksilen	5 dk (x3)
3. Absolü etil	3 dk
4. %96'lık alkol	3 dk
5. %80'lik alkol	3 dk
6. %70'lik alkol	3 dk
7. Distile su	10 saniye
8. Mayers'in Hematosilen	15 dk
9. Çeşme suyu	5 dk (x3)
10. Eozin	5 dk
11. %96'lık alkol	3 dk (x2)
12. Absolü etil alkol	3 dk (x2)
13. Ksilen	5 dk (x3)

3. 5. 3. Periyodik Asit Schiff Boyama Yöntemi

Tablo 3. 4. PAS Boyama Yöntemi

PAS Boyama Yöntemi

1. Periyodik asit (1 g + 100 ml distile su)	7 dk
2. Distile su	3 dk
3. Schiff	18 dk
4. Çeşme suyu	15 dk
5. Distile su	5 dk
6. Hematoksilen	8 dk
7. Çeşme suyu	3 dk
8. Absolü etil alkol	3 dk (x3)
9. Ksilen	3 dk (x3)

3. 5. 4. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi

Tablo 3. 5. IHC Boyama Yöntemi

IHC Boyama Yöntemi

1. Deparafinizasyon	
2. Bond Dewax Solüsyonu	x3 (72°C)

3. Alkol	x3
4. Bond yıkama solüsyonu	5 dk (x3)
5. Bond ER1 solüsyonu	20 dk (100°C)
6. Bond ER1 solüsyonu	12 dk
7. Bond yıkama solüsyonu	x3 (35°C)
8. Bond yıkama solüsyonu	3 dk
9. Peroksit block	10 dk
10. Bond yıkama solüsyonu	x4
11. Primer antikor (Kas-3, VEGF, TJP1)	45 dk
12. Bond yıkama solüsyonu	x4
13. Sekonder antikor	8 dk
14. Bond yıkama solüsyonu	1 dk (x4)
15. Polimer	8 dk
16. Bond yıkama solüsyonu	x2
17. Distile su	x2
18. Mixed DAB refine	10 dk
19. Distile su	x4
20. Hematoksilen	10 dk
21. Distile su	x1
22. Bond yıkama solüsyonu	x1
23. Distile su	x2

3. 6. Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirmeler

Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Her preparattan dairesel ve dairesele yakın şekilde 50 seminifer tübül seçilerek, X10 objektif büyütmede tübülün en uzun ve en kısa kenarları ölçüldü. Bu ölçümlerin ortalamaları kaydedilerek seminifer tübül çapı belirlendi.

Seminifer Epitel Yükseklik Ölçümü

Her preparattan dairesel ve dairesele yakın şekilde 50 seminifer tübül seçilerek,

X10 objektif büyütmede seminifer tübül epitel yüksekliği tübüllerin en ince ve en kalın yerleri dahil edilerek 4 farklı noktadan ölçüldü. Her bir seminifer tübül için bu 4 noktadan elde edilen değerlerin ortalaması alınarak seminifer epitel yüksekliği belirlendi.

Histopatolojik Değerlendirmeler

Histopatolojik skorlama Hess verilerine göre yapıldı. Tübüller, normal, regresif, dejeneratif veya atrofik tübüller olarak sınıflandırıldı (113). Normal tübüller, spermatogenezin ve hücreler arası bağlantıların normal morfolojisini gösterir. Regresif tübüller, bir veya daha fazla anormalliğe sahip seminifer tübüllerdir; hücreler arası sıkı bağlantılar normaldir ancak hücreler arası organizasyon gevşek ve bozulmuştur (piknotik çekirdek, granüler eozinofilik sitoplazma ve karyoliz). Dejeneratif tübüllerde hem germ hücrelerinin hem de Sertoli hücrelerinin hücreler arası sıkı bağlantıları bozularak düzensiz konfigürasyonlar gözlenir. Atrofik tübüller ise Sertoli hücresi ya da birkaç germ hücresi kaybı olan ve aynı zamanda sıkı bağlantı kaybı olan Sertoli hücrelerini içeren tübüllerini temsil eder.

İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

Bouin ile fikse edilip parafin bloklara gömülen testis dokularından 4.5 µm kalınlığında kesitler alınarak IHC boyama yöntemiyle VEGF (E-AB-40004, Elabscience), TJP1 (E-AB-52081, Elabscience) ve Kaspaz-3 (31A1067, Santa Cruz) primer antikorları kullanılarak boyandı.

Testis kesitlerinde VEGF, Kaspaz-3 ve TJP1 immünoreaktivite düzeylerini belirlemek için X20 objektif büyütmede boyanma yoğunluğu ("0": boyanma yok, "1": zayıf boyanma, "2": orta derecede boyanma, "3": kuvvetli boyanma) ve boyanan hücre oranı ("0": boyanma yok, "1": boyanan hücreler<%25, "2": boyanan hücre %25-%50, "3": boyanan hücre>%50) belirlenerek bunların çarpımı ile elde edilen değer immünoreaktivite düzeyi olarak kaydedildi (114).

Sperm Morfolojisi

Epididimisin kauda bölgesi petri kabına alınarak 1 ml %0.9'luk SF yardımıyla likefaksiyon işlemi gerçekleştirildi. Sperm morfoloji analizi için "FertiPro Sperm Morphology Kit" kullanıldı ve tüm işlemler kitle belirtilen talimatlara göre yapıldı (Tablo 3.6.).

Tablo 3. 6. Sperm Morfolojisi Analiz Basamakları

Likefiye edilmiş semen örneği lam üzerine damlatılarak yayma yapıldı ve 37°C'ye getirilmiş hot plate üzerinde 5 dk kurutuldu.
Lamlar, 5 dk boyunca fiksatif solüsyonunda bekletildi
Lamlar, fiksatiftten çıkarılarak fazla sıvının giderilmesi için kurutma kağıdına dikey olarak yerleştirildi.
15 dk boyunca 37°C'ye getirilmiş hot plate üzerinde kurutuldu.
Lamlar, distile suda 7 defa yıkandı.
A boyasına 7 defa batırılıp çıkarıldıktan sonra lamlar, 2 dk boya içinde bekletildi.
Lamlar, fiksatiftten çıkarılarak fazla sıvının giderilmesi için kurutma kağıdına dikey olarak yerleştirildi.
Lamlar, distile suda 7 defa yıkandı ve ardından temiz distile sudan geçirildi.
B boyasına 7 defa batırılıp çıkarıldıktan sonra lamlar, 1 dk boya içinde bekletildi.
Lamlar, fiksatiftten çıkarılarak fazla sıvının giderilmesi için kurutma kağıdına dikey olarak yerleştirildi ve distile suda 7 defa yıkandı.
Lamlar, C boyasına 7 defa batırılıp çıkarıldıktan sonra 1 dk boya içinde bekletildi.
Lamlar, fiksatiftten çıkarılarak fazla sıvının giderilmesi için kurutma kağıdına dikey olarak yerleştirildi ve distile suda 7 defa yıkandı.
Lamlar havada kurutulup, ışık mikroskopunda X40 büyütmede incelendi.

3. 7. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Testis dokuları -80 °C'den çıkarıldı ve çözünmesi beklenmeden hızlı bir şekilde tartıldı. Ağırlıklarının dokuz katı kadar fosfat tamponu dokular üzerine eklendi. +4 C°'de 1 dk boyunca 16000 devir/dk homojenize edildi (IKA, Germany). Bu homojenatların "malondialdehit (MDA)" düzeyleri ölçüldü. Homojenatlar, +4 C° derecede, 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlardan; "Glutatyon (GSH)", "Süperoksit dismutaz (SOD)", "Katalaz (CAT)", "Total oksidan kapasite (TOS)", "Total antioksidan kapasite (TAS)", "Oksidatif stres indeks (OSI)" ve "protein seviyeleri" ölçüldü.

Biyokimyasal Serum Analizleri

Kan numuneleri santrifüj cihazında 20 dakika boyunca 4 °C de 600 x g santrifüj edilerek serumlar alındı. Serumların FSH, LH ve T seviyesini belirlemek için Bioassay Technology Laboratory (BT LAB) ELISA Kitler kullanıldı. Oda sıcaklığında; tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kit prosedürlerinde tarif edildiği gibi hazırlandı. Numuneler kuyucuklara eklendi ve iyice çalkalandı. 60 dakika 37°C'de inkübe edildi. 50 µl A ve B solüsyonları eklendi ve 10 dakika 37°C'de bekletildikten sonra 50 µl durdurma solüsyonu ilave edildi ve 450 nm okumalar gerçekleştirildi. FSH ve LH için sonuçlar IU/mL, T için ng/L, olarak ifade edildi (115).

MDA Analizi

1.5 ml %1 H₃P0₄ ve 0.5 ml %0.6 tiyobarbitürik asit (TBA), 0.25 ml doku homojenatı ile karıştırıldı. TBA'nın tamamen çözünmesi için 30°C'ye ısıtıldı. Karışım 100°C'de 40 dk boyunca ısıtıldı. Bu sürenin sonunda, tüplerde kırmızı bir renk oluştu ve çeşme suyunda soğutulduktan sonra her numuneye 2 ml n-bütanol eklendi. 5 dakika boyunca her tüp vortekslendi. 5 dakikanın sonunda, örnekler 25°C'de 4500 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. n-bütanol fazı olan üstte kalan süpernatant (250 µl) dikkatlice alındı ve ayrı ayrı kuvartz mikrolept kuyucuklarına yerleştirildi. 535 nm'de okuma gerçekleştirildi. Kör, n-bütanol ve standart eğrisi, tetraetoksipropan kullanılarak oluşturuldu. Sonuçlar nmol/gram yaş doku olarak değerlendirildi (116).

Redükte GSH Analizi

Süpernatant, trikarboksilik asit (TCA) ile deproteinize edildi. Bu amaçla 125 µl örneğe 125 µl TCA eklendi. 25 dakika boyunca karışım iyice vortekslendikten sonra +4°C ve 4500 rpm'de santrifüj edildi. Böylece proteinden arındırılmış süpernatant elde edildi. 29 µl deproteinize örnek, 29 µl DTNB ve 235 µl Na₂HPO₄ olacak şekilde her örnek ayrı ayrı mikrolept kuyucuklarına eklendi. Biraz vorteks yapılarak 5 dk beklendi. 410 nm'de okumalar beş dakika içinde yapıldı. Sonuçlar nmol/gram yaş doku olarak değerlendirildi (117).

SOD Aktivitesi Analizi

9,13 mg Ksantin 200 ml distile suda çözündü, 23 mg Na₂EDTA 100 ml distile suda çözündü, 12,3 mg Nitro blue tetrazolium (NBT) 100 ml distile suda çözündü, 30 mg Bovine serum albümin (BSA) 30 ml distile suda çözündü, 2,54 gr Na₂CO₃ 60 ml distile

suda çözüldü ve böylece stok çözelti oluşturuldu. Stoktan 2,35 ml, 50 µl Ksantin oksidaz (XO) ve 500 ml örnek, propilen tüplere konarak iyice vortekslendi. 25 dk inkübasyona bırakıldı ve üzerine 1 ml CuCl_2 ilave edildi. Bu yöntem ile elde edilen mavi renkli farmazonun 560 nm'deki absorbansına dayanarak SOD aktivitesi hesaplandı. Kör olarak distile su kullanıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı (118).

KAT Aktivitesi Analizi

Toplam 4,205 gr potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve 2,71 gr disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 1 L distile su içerisinde çözüldü. Bu tampona hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edilerek 240 nm'de UV spektrumda gerekli düzenlemeler yapıldı. 10 µl örnek ve 2990 ml H_2O_2 'li fosfat tamponu absorbansta gözlenen bu azalma kinetik okuma yapılarak 1 dk boyunca kaydedilerek enzim aktivitesi ölçüldü. Enzimin aktivitesi K/mg protein olarak hesaplandı (119).

Protein Analizi

Dokuların protein içerikleri, enzim aktivitelerinin belirlenmesi için gereklidir. Dokulardaki protein miktarını belirlemek için Lowry yaklaşımı kullanıldı. Oluşan rengin absorbansı 660 nm bir spektrofotometre kullanılarak ölçüldü ve dokulardaki protein miktarları belirlendi (120).

TAS Analizi

Dokulardan TAS analizi için "TAS Rel Assay marka kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Turkey)" kullanıldı. Ölçüm, antioksidan moleküllerin renksizleşmesi prensibine dayanarak yapıldı. Kit talimatlarına göre adımlar sırayla uygulandı. Öncelikle ölçüm yapılacak cihaz 37°C 'de, 7 saniye shake, 23 saniye delay ve 660 nm'de okuma yapacak şekilde ayarlandı. 12 µl örnekler kuyucuklara eklendi. Level 1, Level 2 ve standart her birinden üç tane olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Bunların üzerine 200 µl reaktif 1 eklendi ve 660 nm'de beklemeden 1. okuma yapıldı. Sonra, cihaz 37°C 'de 10 saniye shake, 4.30 dk delay ve 660 nm'de okuma yapacak şekilde ayarlandı. Her bir kuyucuğa 30 µl reaktif 2 eklendi ve bir kez daha ölçüldü. Kit prosedüründe belirtildiği şekilde hesaplamalar yapıldı (121). Sonuçlar mmol Trolox Eqv/L olarak hesaplandı.

TOS Analizi

Dokulardan TOS analizi için "TAS Rel Assay marka kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Turkey)" kullanıldı. Ferrik iyonlar, örnekteki oksidanların ferrous iyon şelator komplekslerini ferrik iyonlara dönüştürmesiyle kromojenik bir çözelti ile renkli bir kompleks oluşturur. Kitte belirtildiği gibi, TOS seviyesi, 25 °C ayarlanmış cihazda 530 nm'de renkli kompleksin absorbansını ölçerek ve gerekli hesaplamaları yaparak ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv/L}$ olarak ifade edildi (122).

3. 8. İstatistiksel Analizler

Sayısal veriler medyan, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi. İkiden çok bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Bağımlı iki grup karşılaştırmasında Wilcoxon eşleştirilmiş iki örneklem testi, ikiden çok bağımlı grubun karşılaştırılmasında ise Friedman testi ve Conover ikili karşılaştırma yöntemi uygulandı. Tablolarda ikili karşılaştırma sonuçları, bağımsız gruplar için a,b,c üst indisleriye, bağımlı gruplar için x,y,z üst indisleriyle gösterildi. Ölçümler arası istatistiksel farklılıklar, farklı üst indisler ile gösterildi. Tüm testlerde iki-yönlü anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları ve Kan-Glukoz Seviyeleri

Sıçanlara DM indüklendikten 4 gün sonra deney süreci başlatıldı. Deney başlangıcından itibaren 14 günde bir hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü. K, DM, DM+O gruplarında deney başlangıcı ile deney sonundaki vücut ağırlıkları arasında artış yönünde anlamlı değişiklik gözlemlendi. Deney başlangıcı ve sonu arasındaki vücut ağırlıkları değişim oranları açısından K (56 gr) ve O (56 gr) grubu benzer, DM (42 gr) grubu K grubuna göre azalmış, DM+O (65 gr) grubu ise DM gruplarındakine göre artmış olarak belirlendi. 42. günde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p = 0,035$).

Tablo 4. 1. Sıçanların Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Vücut Ağırlıkları

Grup (n=7)	1. Gün (gr)	14. Gün (gr)	28. Gün (gr)	42. Gün (gr)	p
K	^x 272 (244-301)	^x 270 (215-303)	^y 305 (265-340)	^z 328 (301-364) ^{a,b}	0,001
DM	^x 270 (252-277)	^{x,y} 278 (250-285)	^{y,z} 294 (264-311)	^z 312 (272-348) ^a	0,006
DM+O	235 (200-305)	244 (198-310)	260 (207-328)	300 (200-371) ^a	0,319
O	^x 308 (220-350)	^x 318 (228-350)	^x 332 (262-344)	^y 364 (298-396) ^b	0,006
p	0,155	0,168	0,151	0,035	

K, DM ve DM+O gruplarındaki sıçanların kan-glukoz seviyesi, zaman içinde ölçümlerde anlamlı değişiklik göstermemektedir. O grubunda zaman içinde ölçümlerde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir ($p = 0,025$). Tüm zaman noktalarında gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p < 0,001$).

Tablo 4. 2. Sıçanların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Kan-Glukoz Seviyeleri

Grup (n=7)	1. Gün (mg/dl)	14. Gün (mg/dl)	28. Gün (mg/dl)	42. Gün (mg/dl)	p
K	85 (76-110) ^a	86 (67-103) ^a	85 (77-111) ^a	84 (76-104) ^a	0,419
DM	374 (302-474) ^b	438 (127-478) ^b	389 (133-497) ^b	383 (146-411) ^b	0,774
DM+O	352 (160-600) ^b	375 (97-538) ^b	191 (129-551) ^b	180 (121-407) ^b	0,478
O	^x 113 (77-159) ^a	^y 91 (77-120) ^a	^x 100 (79-156) ^a	^x 115 (78-133) ^c	0,025
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

4. 2. Testis Ağırlıkları

Testis ağırlıkları açısından K, DM ve DM+O gruplarında benzerlik varken, O

grubunda ağırlıklar daha yüksek bulunmuştur. Sağ ve sol testis ağırlıkları arasındaki farklar, özellikle O grubunda anlamlıdır ($p < 0.05$).

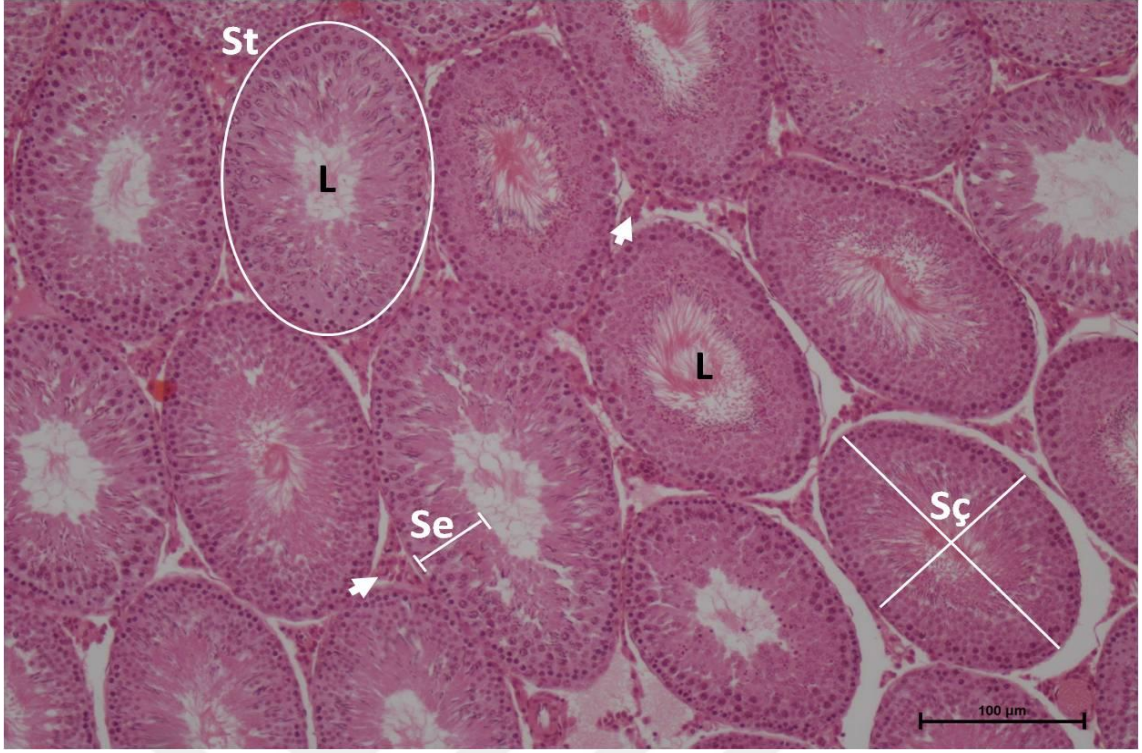
Tablo 4. 3. Testis Ağırlıkları

Grup (n=7)	Sağ testis (gr)	Sol testis (gr)	p
K (n=7)	1,37 (1,25-1,5) ^a	1,35 (1,3-1,48) ^a	0,395
DM (n=7)	1,39 (1,26-1,53) ^a	1,43 (1,34-1,49) ^a	0,172
DM+O (n=7)	1,44 (1,17-1,51) ^a	1,45 (1,15-1,59) ^{a,b}	0,396
O (n=7)	1,57 (1,37-1,73) ^b	1,52 (1,4-1,69) ^b	0,126
p	0,024	0,016	

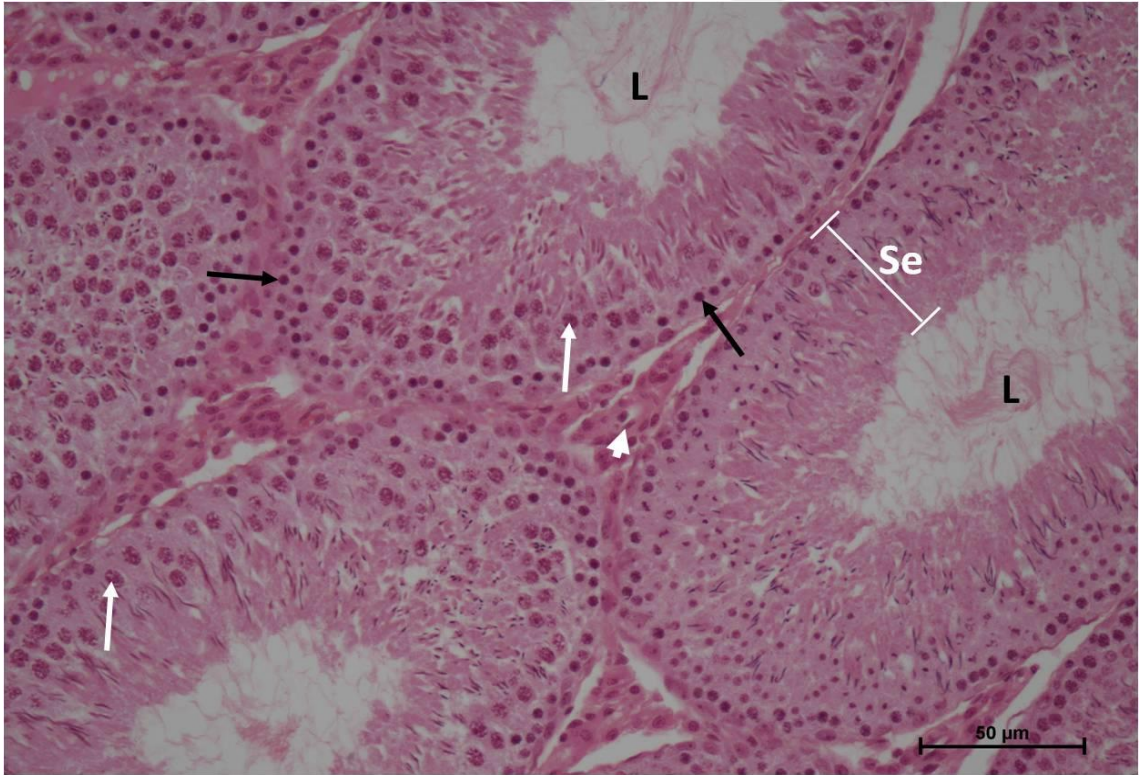
4. 3. Işık Mikroskopik Bulgular

K Grubu

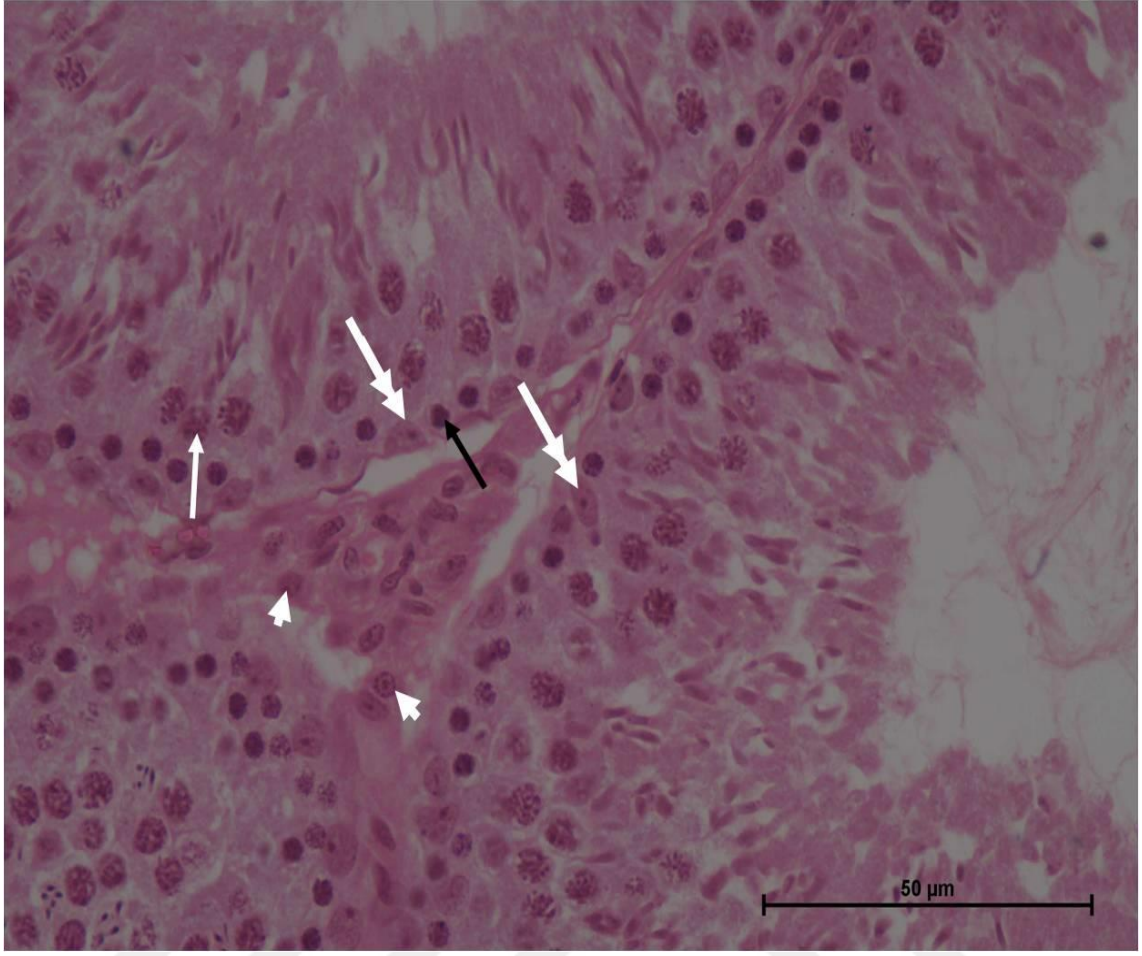
H&E boyaması uygulanmış testis kesitlerinde, seminifer tübüller normal histolojik yapıda gözlemlendi. Seminifer tübüllerin belirgin bir bazal membran üzerine oturmuş seminifer epitel ile döşeli olduğu görüldü. Seminifer tübül epiteli içerisindeki Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinin rahatlıkla ayırt edilebildiği ve seminifer tübüllerin çoğunun lümeninde spermatozoonların mevcut olduğu saptandı. (Şekil 4.1, 2, 3). İnterstisyel bağ dokusu alanları normal histolojik yapı ve genişlikte izlenmiş olup doku içerisindeki Leydig hücreleri, normal histolojik yapı ve yoğunlukta izlendi. Vasküler yapılar, lümenleri açık ve olağan yapıda değerlendirildi.



Şekil 4. 1. K grubu. Seminifer tübül (St), seminifer tübül epiteli (Se), seminifer tübül lümeni (L), seminifer tübül çapı (Sç), interstisyel bağ dokusu (ok başı). H&E, X10.



Şekil 4. 2. K grubu. Seminifer tübül epiteli (Se), seminifer tübül lümeni (L), spermatozoyum (siyah ok), primer spermatozit (beyaz ok), interstisyel doku içinde damar (ok başı). H&E, X20.



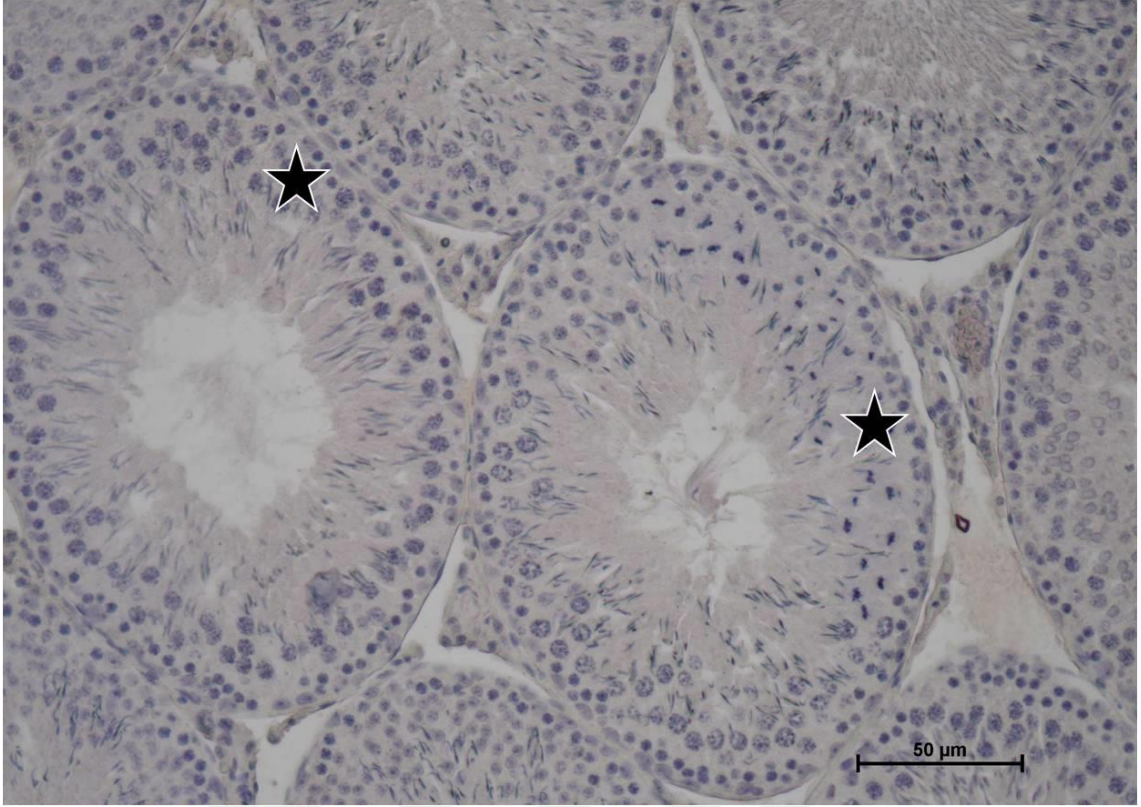
Şekil 4. 3. K grubu. Spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), Sertoli hücresi (çift başlı ok), interstisyel doku içinde Leydig hücresi (ok başı). H&E, X40.

PAS boyaması uygulanmış testis kesitlerinde, seminifer tübüllerin bazal membranları, tübülleri periferden saracak şekilde düzenli, intakt ve kuvvetli PAS+ boyanmış olarak izlendi. (Şekil 4.4).

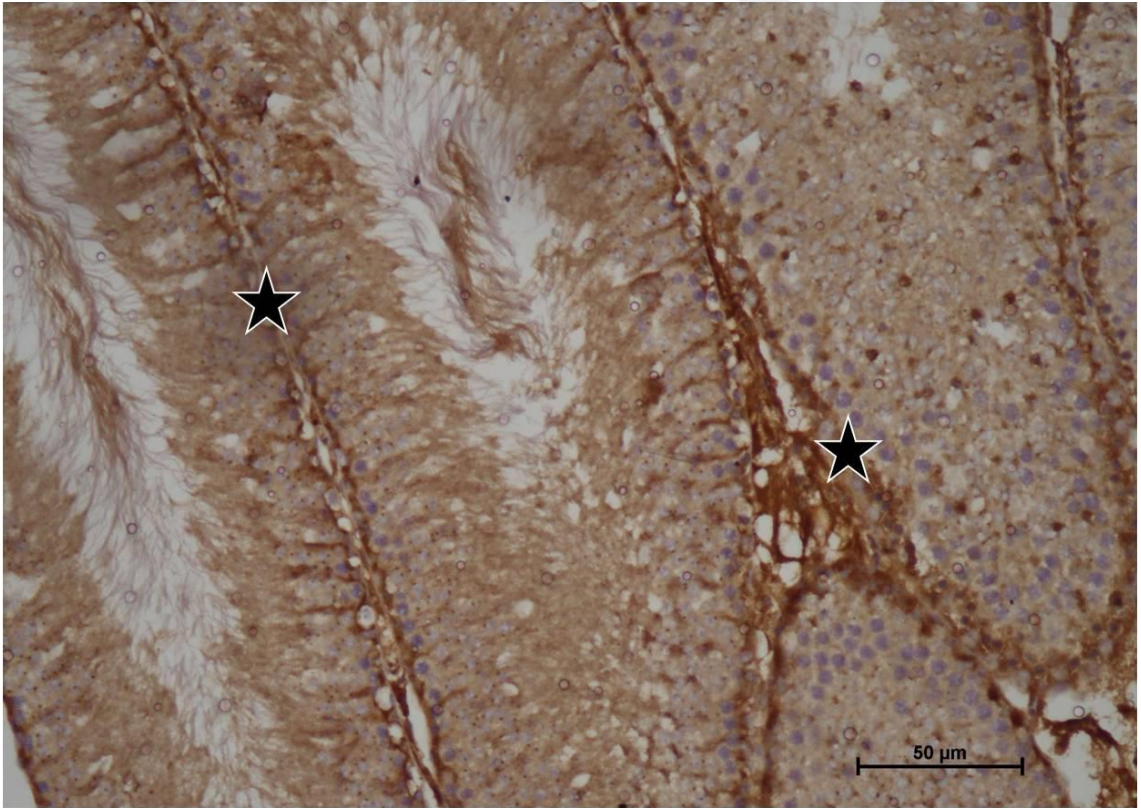


Şekil 4. 4. K grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, X20.

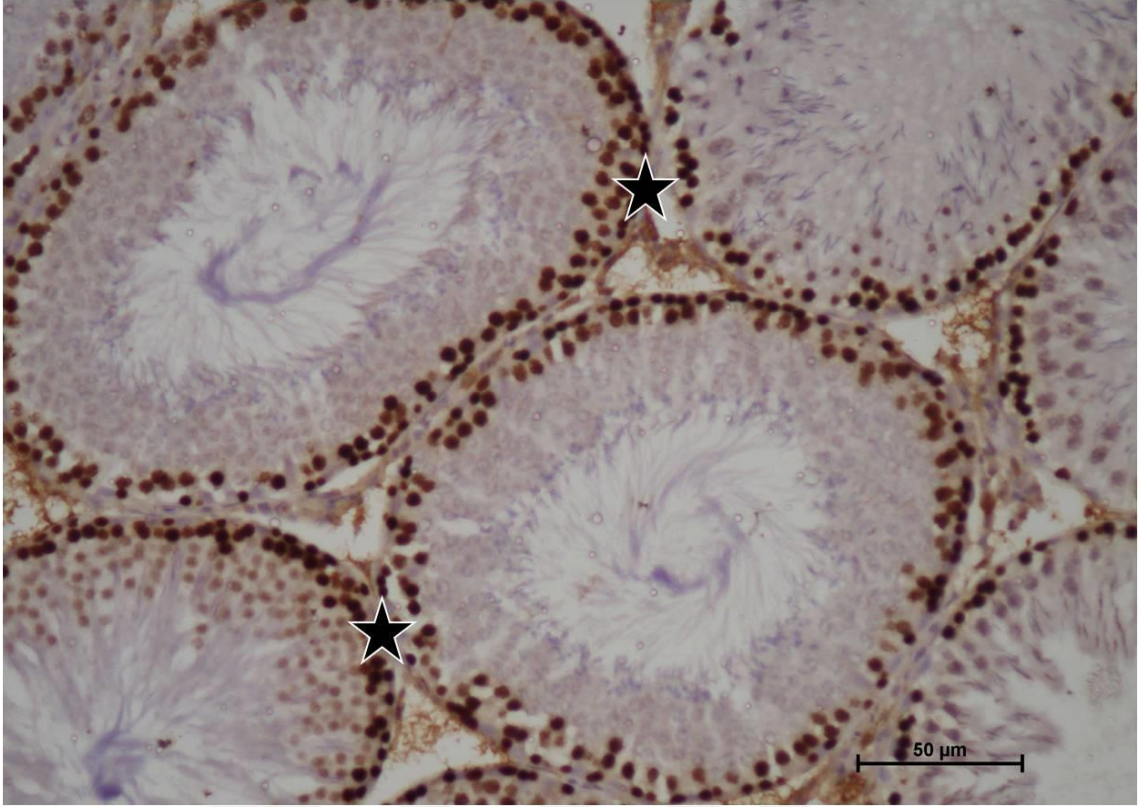
K grubu İmmünohistokimyasal olarak anti-kaspaz uygulanan testis kesitlerinde pozitif Kas-3 immünreaktivitesi çok sınırlı alanlarda minimal düzeyde saptandı (Şekil 4. 5.). VEGF ve TJP1 immünreaktivite düzeyleri yaygın kuvvetli pozitif düzeyinde saptandı (Şekil 4. 5, 6) (Tablo 4. 6.).



Şekil 4. 5. K Grubu. Kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmiyor. (yıldız). IHC, X20.



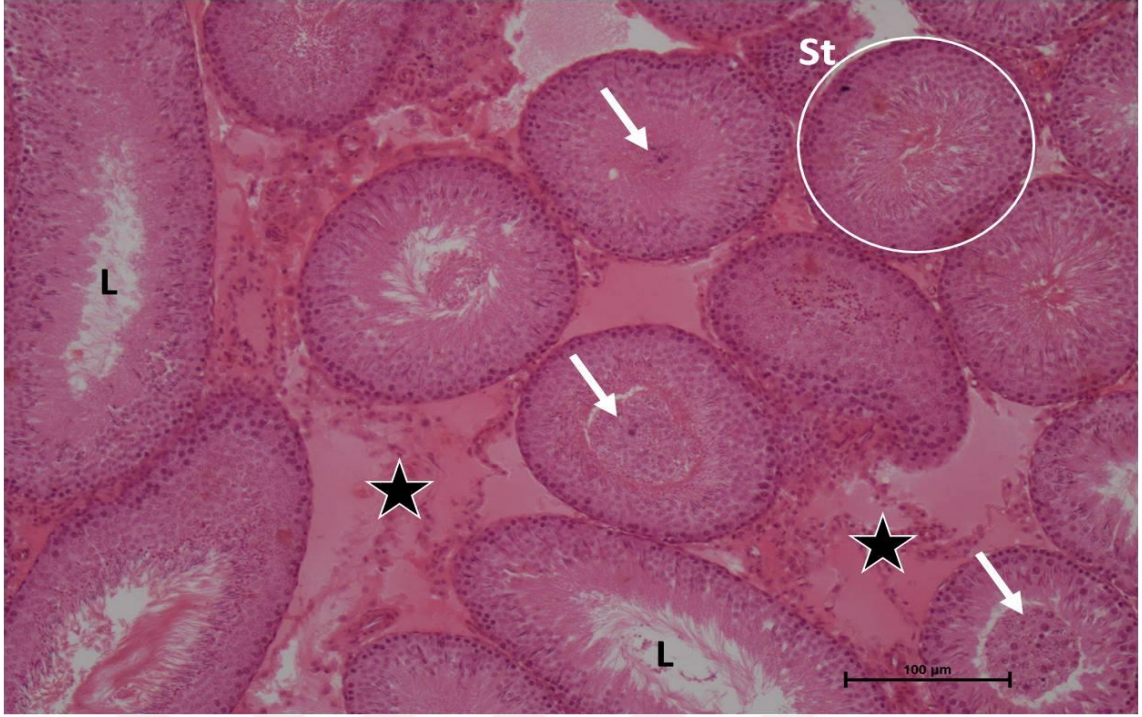
Şekil 4. 6. K grubu. VEGF immünreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.



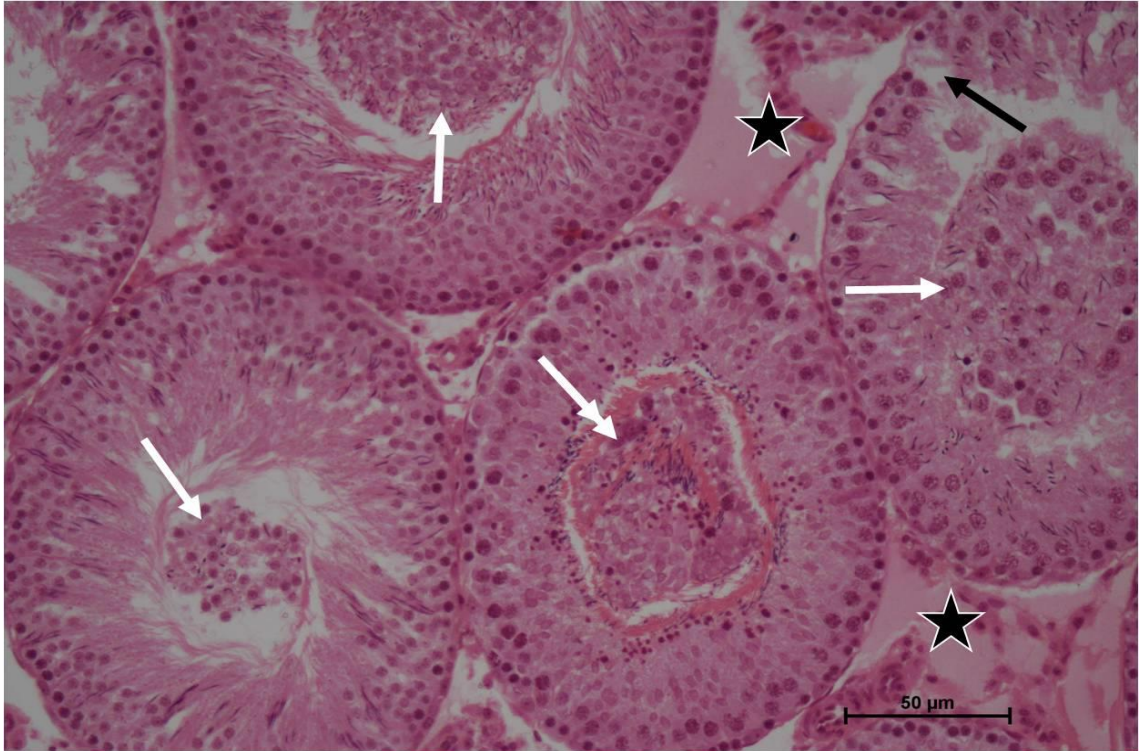
Şekil 4. 7. K grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.

DM Grubu

DM grubunda H&E boyama uygulanmış testis kesitlerinde, bazal sınırları düzensiz, seminifer epitelde spermatogenik seri hücrelerinde dökülme ve ayrılma şeklinde alanlar tespit edildi, çok sayıda seminifer tübül lümeninde yer yer tüm lümeni dolduracak şekilde dejeneratif hücre birikimleri saptandı. Bazı seminifer tübüllerde seminifer epitelin parsiyal ve total nekroza uğradığı görüldü. Bazı tübüllerde, lümendeki birikimlerin hyalinizasyon gösterdiği tespit edildi. İnterstisyel alanlarda belirgin ve yaygın ödem ve buna bağlı olarak interstisyel hücrelerin dağınık olduğu ve saçılmış olduğu görüldü. İnterstisyel alandaki vasküler yapılarda genellikle konjesyon ve duvar yapısının zayıflamış olduğu izlendi (Şekil 4. 8, 9, 10, 11).



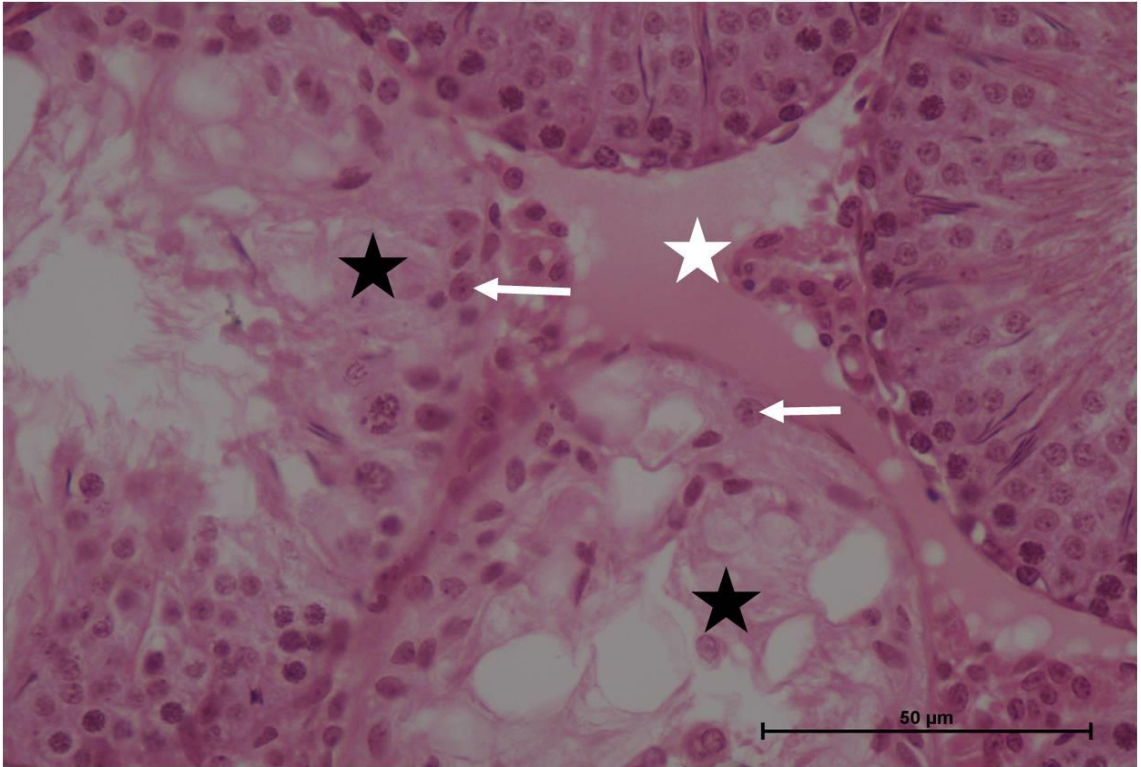
Şekil 4. 8. DM grubu. Seminifer tübül (St) lümeninde immatür seminifer epitel hücre kümeleri (ok), seminifer tübül lümeni (L), interstisyel bağ dokusu alanlarda yaygın ödem (yıldız). H&E, X10.



Şekil 4. 9. DM grubu. Seminifer tübül lümeninde farklı gelişim aşamalarında dejeneratif seminifer epitel hücre kümeleri (ok), seminifer tübül lümeninde dejeneratif hücresel birikim ve hyalinizasyon (çift başlı ok), interstisyel bağ dokusu alanlarda ödem (yıldız). H&E, X20.



Şekil 4. 10. DM grubu. Seminifer tübül epitel hücrelerinde dökülme ve ayrılma şeklinde hasar (yıldız). H&E, X20.



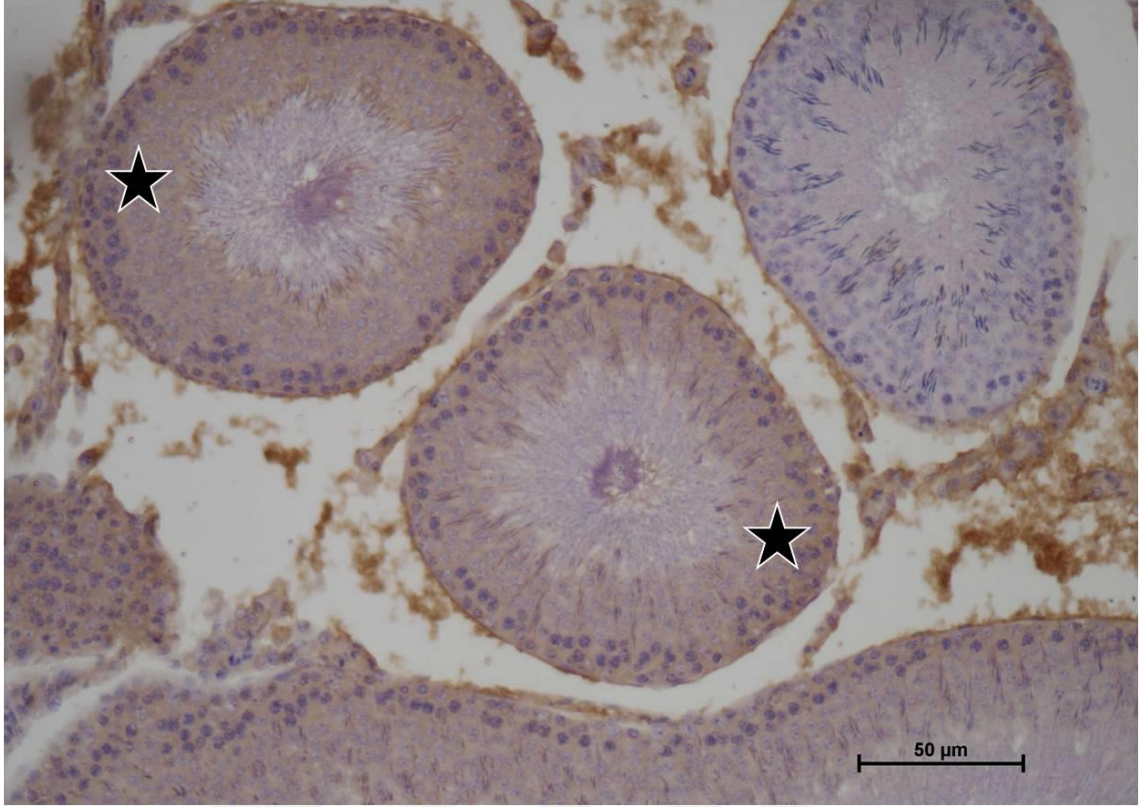
Şekil 4. 11. DM grubu. Seminifer tübül epitel hücrelerinde nekroz (siyah yıldız), Sertoli hücresi (ok), interstisyel bağ dokusu alanlarda ödem (beyaz yıldız). H&E, X40.

DM grubu PAS boyanan kesitlerde seminifer tübül bazal membranlarında yaygın şekilde seminifer epitelden ayrıldığı, ondüle seyreden yer yer kesintiye uğramış ve zayıf boyanan bazal membran yapısı gözlendi ( ekil 4. 12).

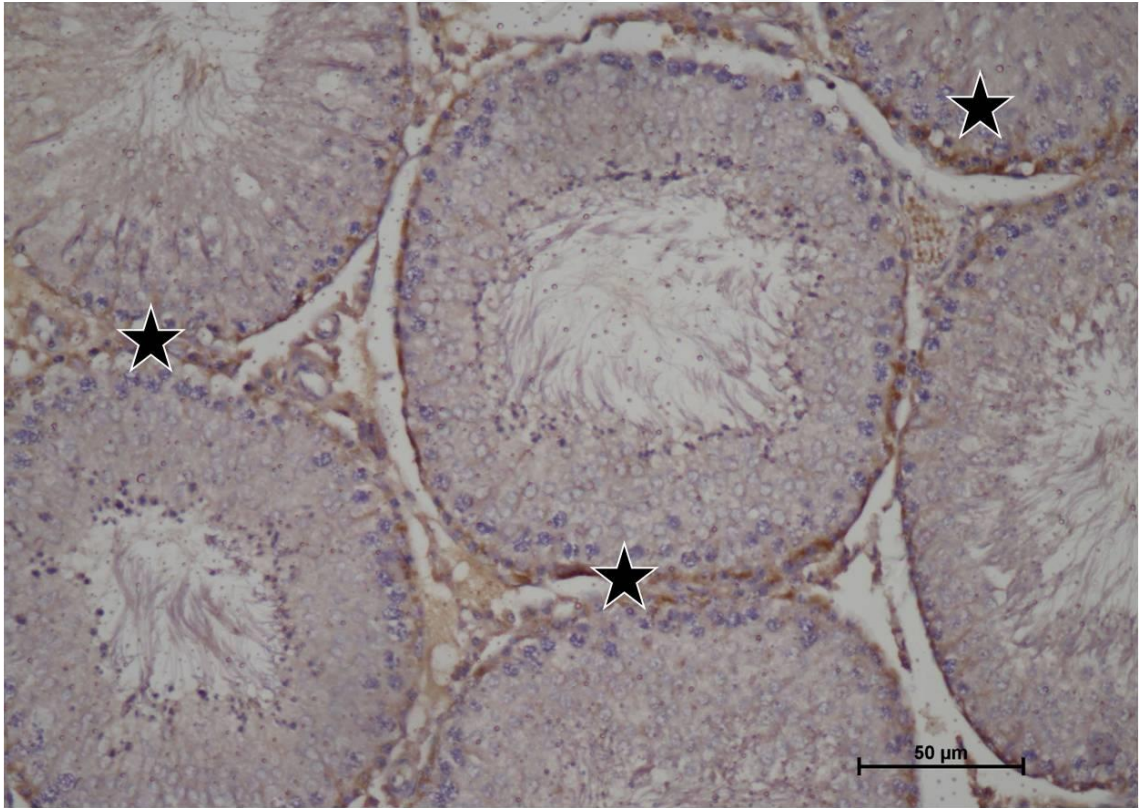


Şekil 4. 12. DM grubu. Seminifer tübül bazal membranlarında ayrılma ve ondülasyon şeklinde hasar (ok). PAS, X20.

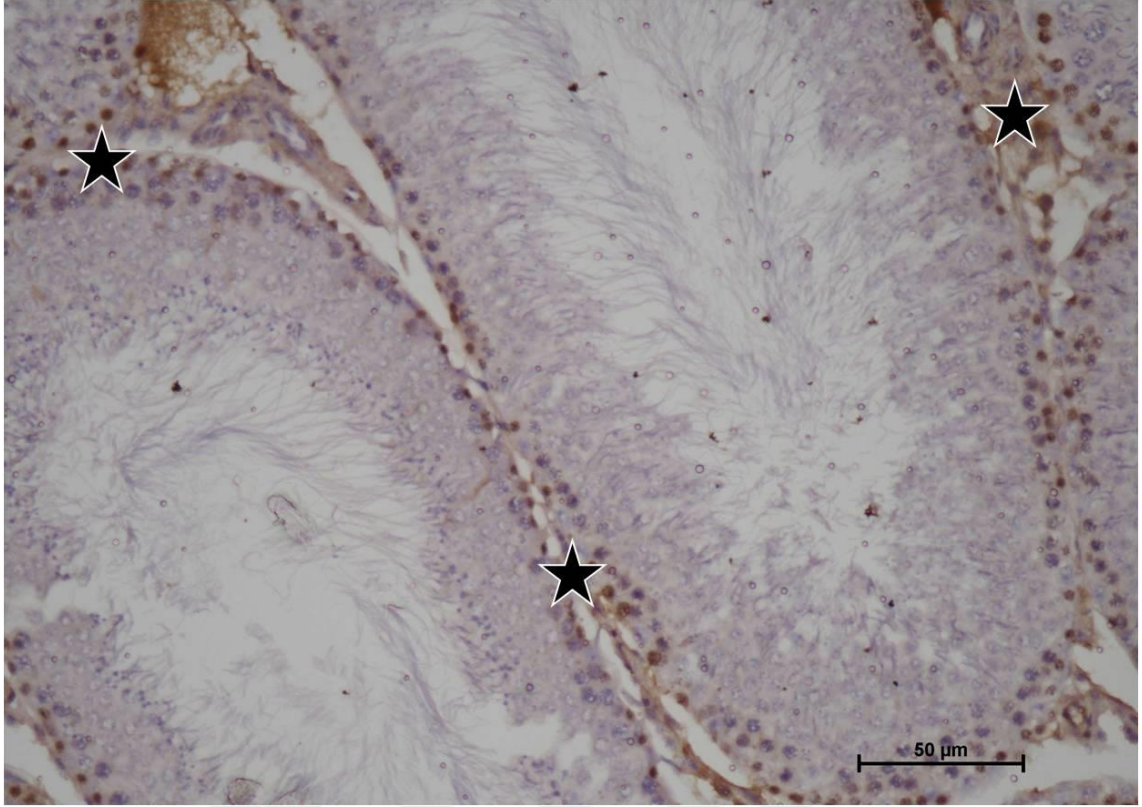
DM grubu İmmünohistokimyasal olarak anti-kaspaz uygulanan testis kesitlerinde seminifer tübül epiteli ve intertisyel alanlarda kaspaz-3 immünreaktivitesi pozitif olarak tespit edildi ( ekil 4. 13). VEGF ve TJP1 immünreaktivitesi pozitif izlenmekle birlikte genellikle immünreaktivite düzeyi düşük olarak izlendi ( ekil 4. 14, 15) (Tablo 4. 6.).



Şekil 4. 13. DM grubu. Kaspaz-3 immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.



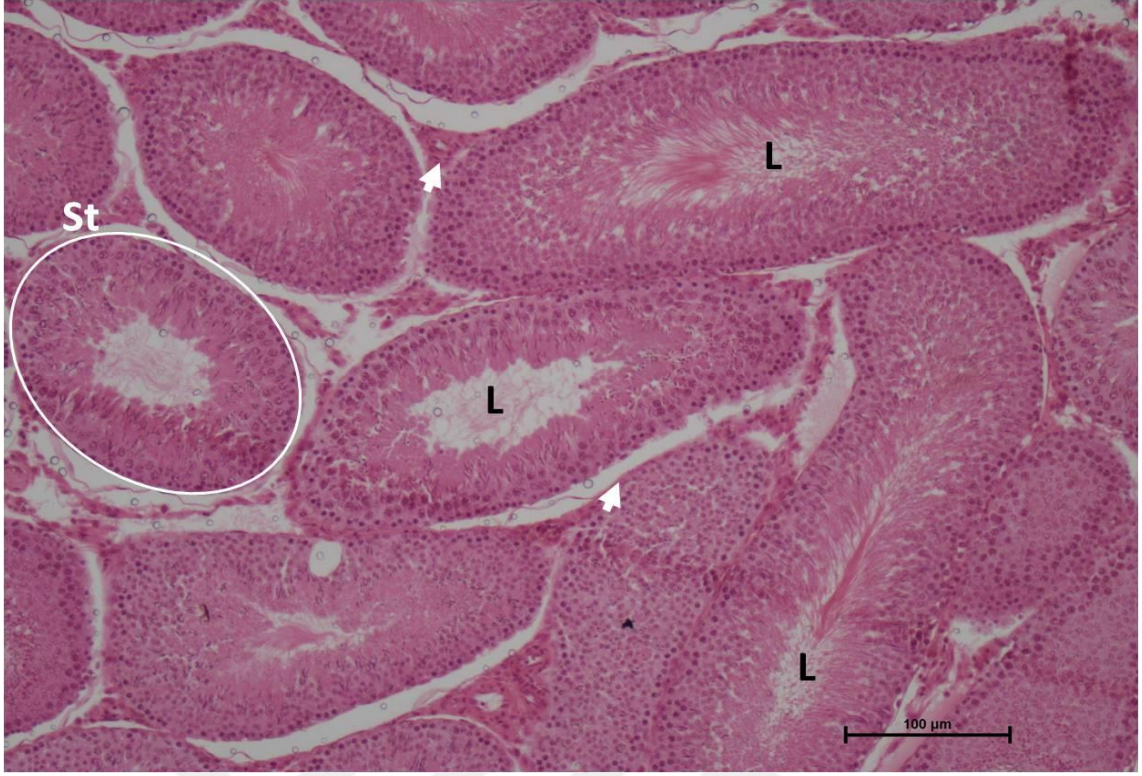
Şekil 4. 14. DM grubu. VEGF immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.



Şekil 4. 15. DM grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.

DM+O Grubu

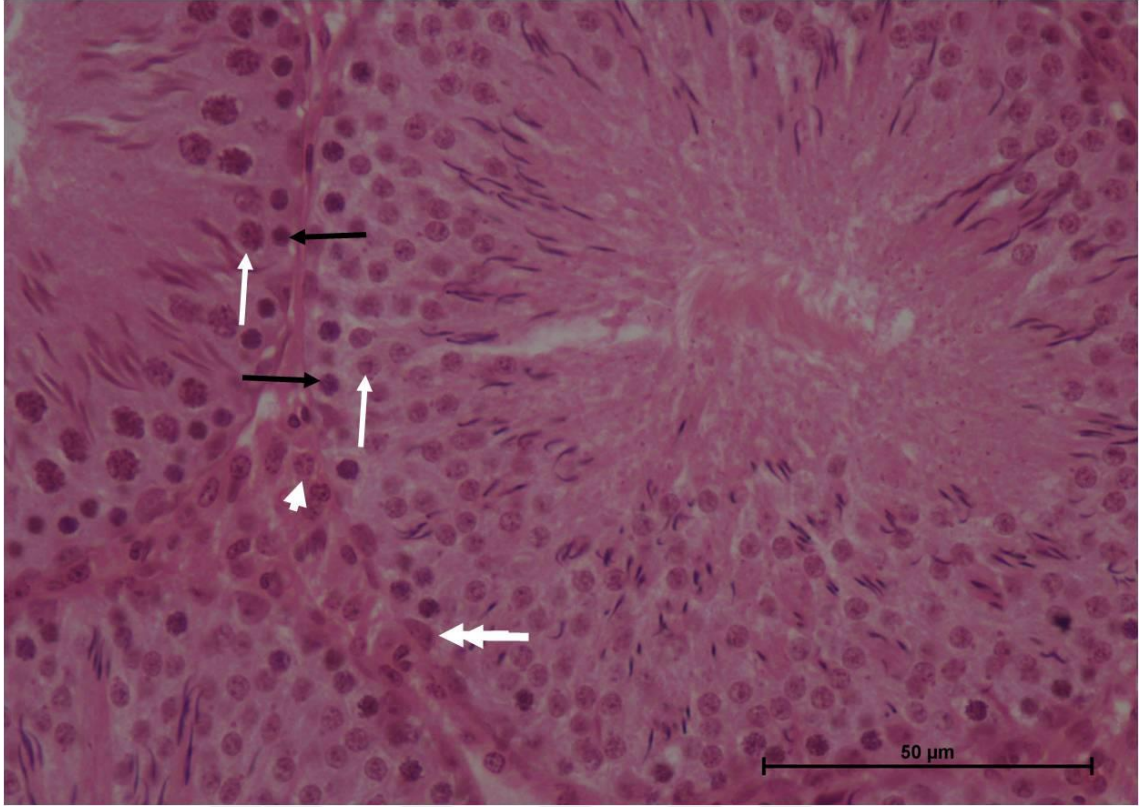
H&E boyaması uygulanmış testis kesitlerinde, seminifer tübüller genel olarak normal histolojik yapıda gözlemlendi. Seminifer tübüllerin interstisyel bağ dokuyula olan sınırları düzenli ve seminifer epitel olağan yapıda izlenmekle birlikte bazı tübüllerde seminifer epiteli oluşturan hücreler arasında ayrılmalar ve nadiren seminifer epitel içinde küçük vakuoler yapılar izlendi. Seminifer tübüllerin lümenleri açık olarak izleniyordu ve çoğu tübül lümeninde spermatozoonların mevcut olduğu görüldü. İnterstisyel bağ doku alanları içerisinde yer yer minimal düzeyde ödem tespit edildi. Leydig hücreleri normal histolojik yapı ve yoğunlukta görüldü. İnterstisyel alan içerisindeki damar yapıları normal histolojik görünümde ve genellikle lümenleri açık olarak izlendi (Şekil 4. 16, 17, 18).



Şekil 4. 16. DM+O grubu. Seminifer tübül (St), seminifer tübül lümeni (L), interstisyel bağ dokusu (ok başı). H&E, X10.

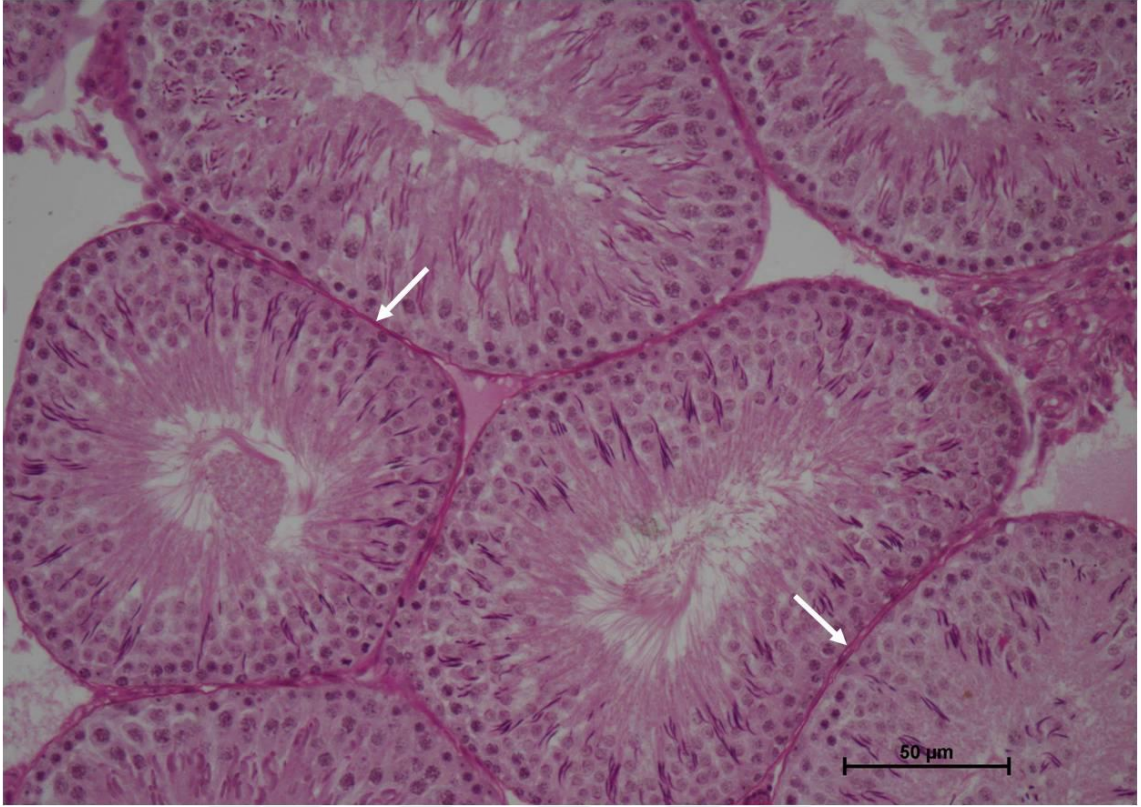


Şekil 4. 17. DM+O grubu. Seminifer tübül lümeni (L), spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), interstisyel bağ doku içinde damar (ok başı). H&E, X20.



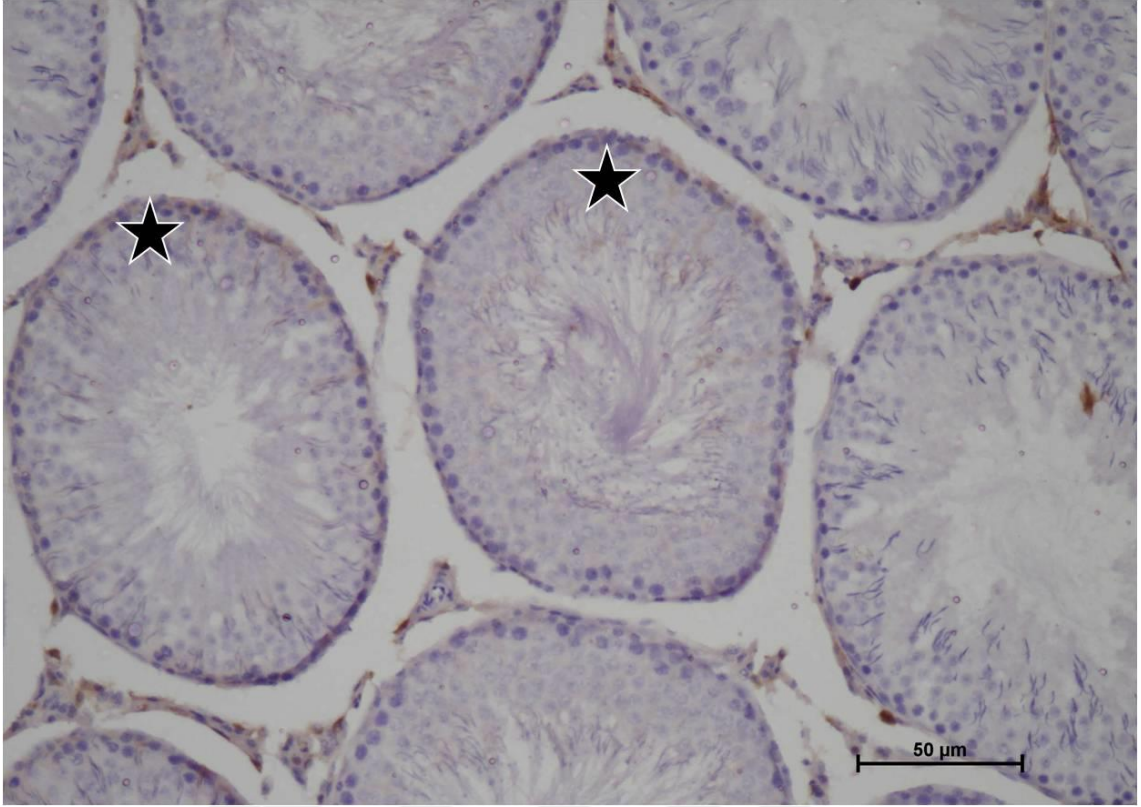
Şekil 4. 18. DM+O grubu. Spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), Sertoli hücresi (çift başlı ok), interstisyel doku içinde Leydig hücresi (ok başı). H&E, X40.

PAS boyaması uygulanan testis kesitlerinde seminifer tübül bazal membranları, PAS+ boyanmış olarak genellikle düzenli ve intakt yapıda izlendi. Ancak bazı alanlarda bazal membranın çevrelediği seminifer epitelden ayrıldığı ve ondüle seyrettiği kısa alanlar mevcuttu (Şekil 4. 19.)

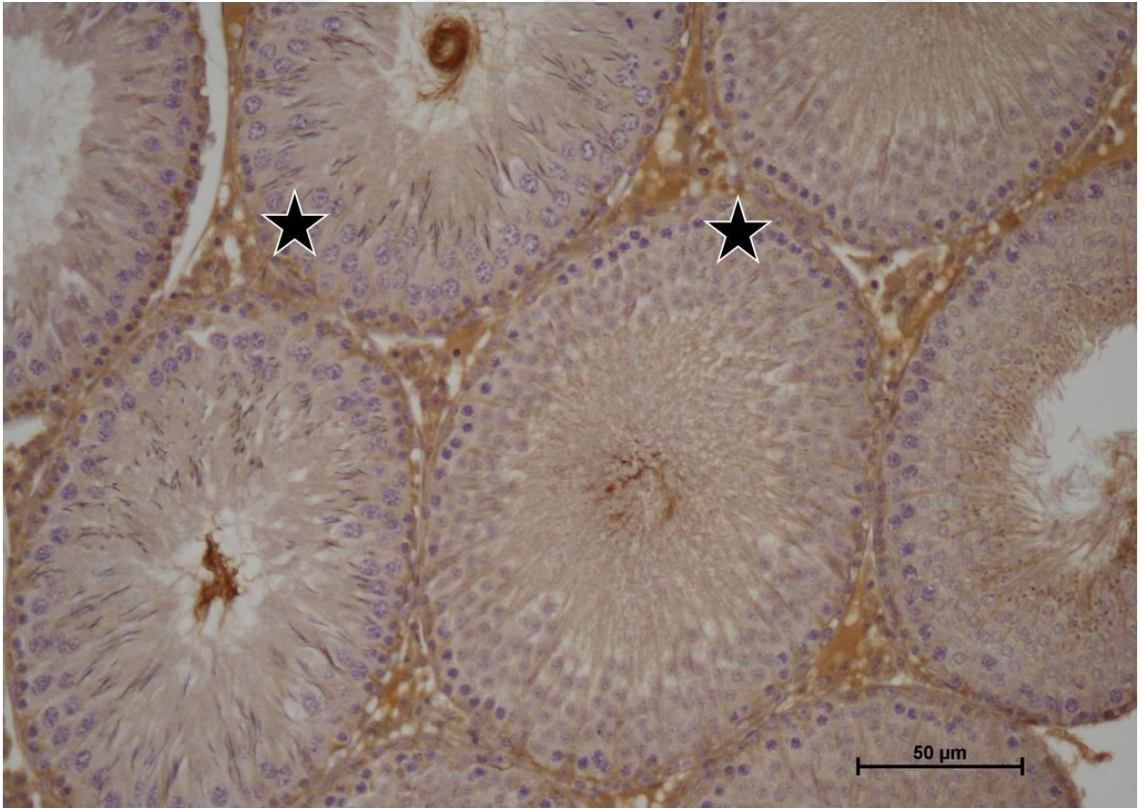


Şekil 4. 19. DM+O grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, X20.

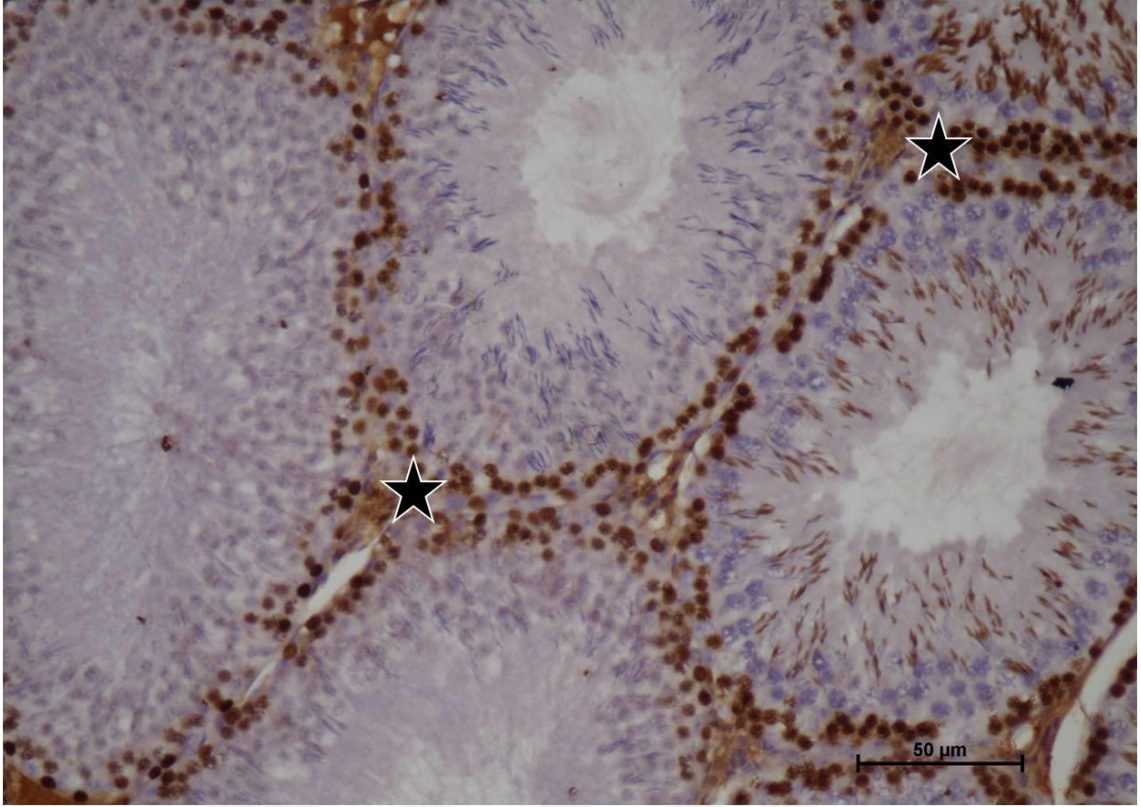
DM+O grubu İmmünohistokimyasal olarak anti-kaspaz uygulanan testis kesitlerinde Kas-3 immünreaktivite pozitifliği K grubu ile benzer olarak sınırlı alanlarda minimal düzeyde saptandı (Şekil 4. 20.). VEGF ve TJP1 immünreaktivite düzeyleri genellikle yaygın ve kuvvetli pozitif düzeyinde belirlendi (Şekil 4. 21, 22) (Tablo 4. 6.).



Şekil 4. 20. DM+O grubu. Kaspaz-3 immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.



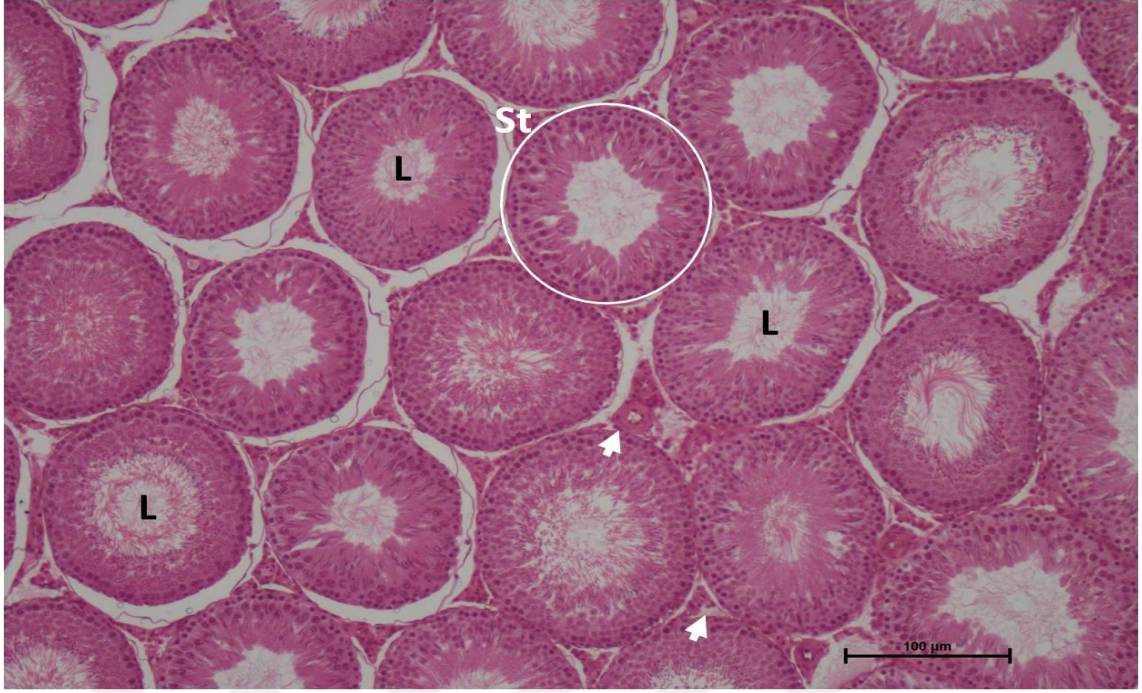
Şekil 4. 21. DM+O grubu. VEGF immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.



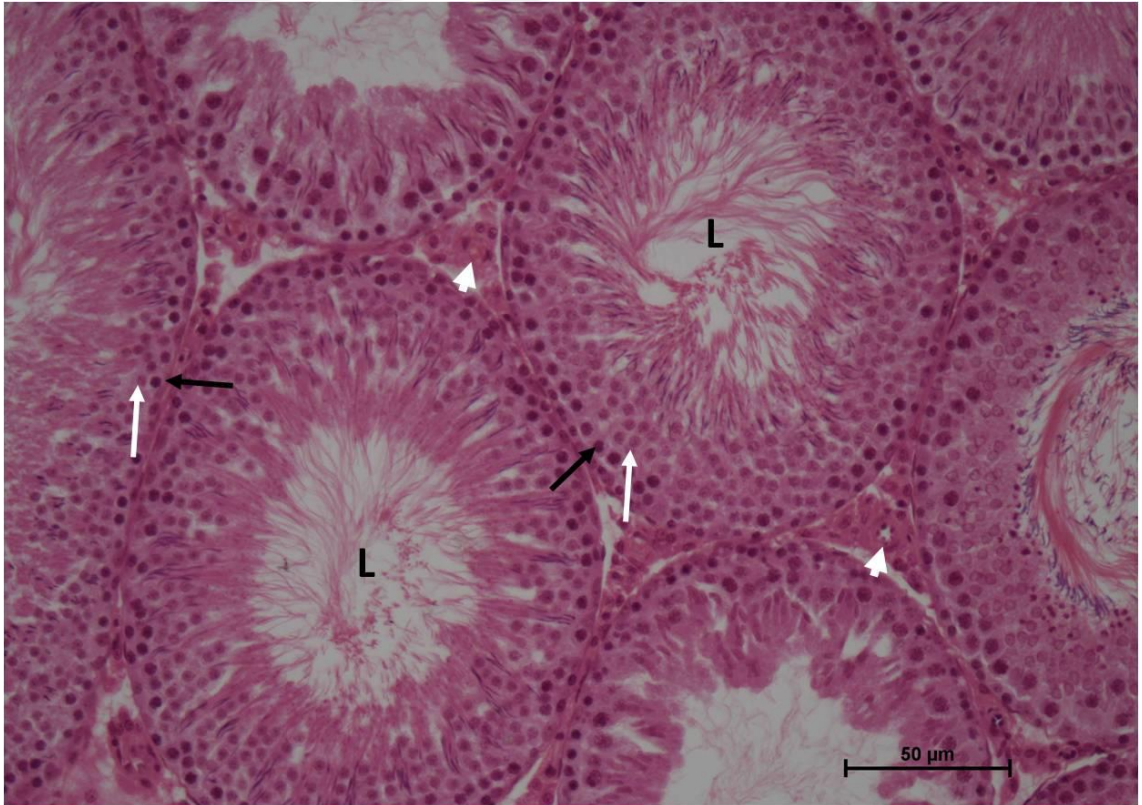
Şekil 4. 22. DM+O grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.

O Grubu

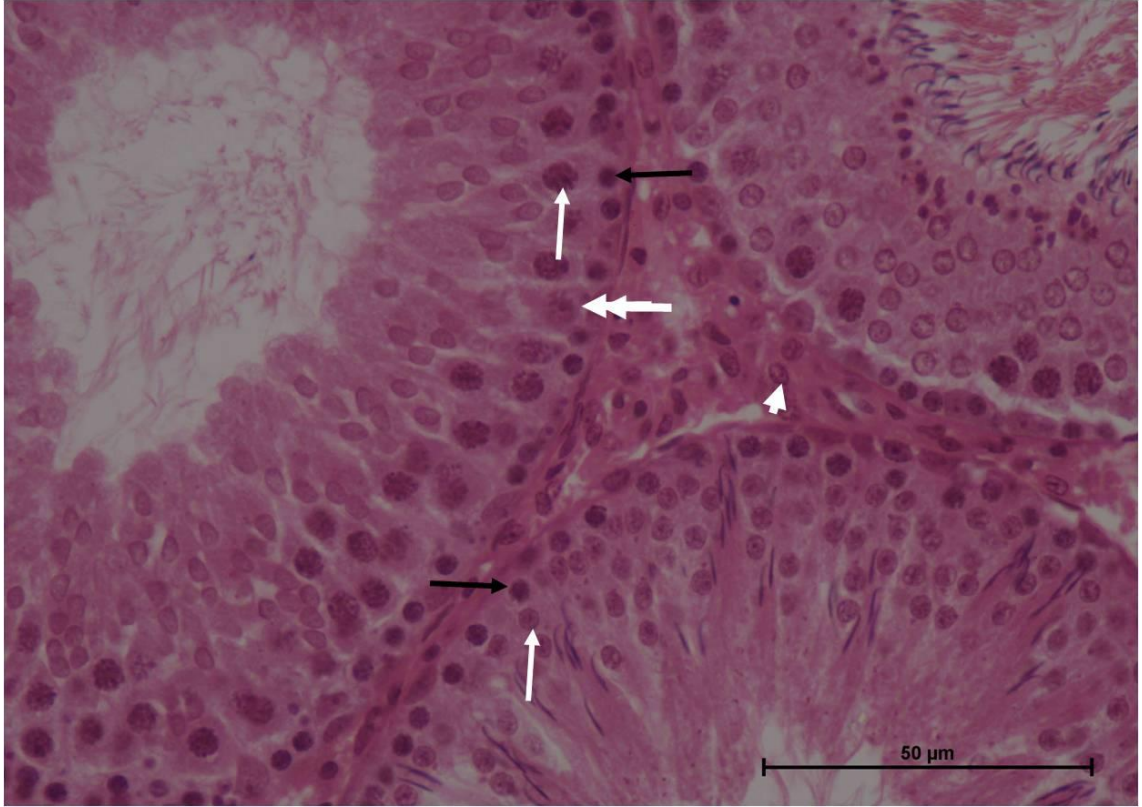
H&E ile boyanan kesitlerde, seminifer tübülleri normal histolojik yapı ve düzende izlendi. Seminifer tübülleri interstisyel bağ dokusuyla olan sınırları düzgün ve seminifer epitel hücreleri kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde düzenli tabakalanma göstermekteydi. Seminifer tübülleri lümeni açık ve genellikle spermatozonlar içerir şekilde görüldü. (Şekil 4. 23, 24, 25). İnterstisyel bağ dokusu alanları normal histolojik yapı ve genişlikte izlendi. İnterstisyel alanda Leydig hücreleri ve vasküler yapılar normal histolojik yapıda değerlendirildi.



Şekil 4. 23. O grubu. Seminifer tübül (St), seminifer tübül lümeni (L), interstisyel bağ dokusu (ok başı). H&E, X10.



Şekil 4. 24. O grubu. Seminifer tübül lümeni (L), spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), interstisyel bağ doku içinde damar (ok başı). H&E, X20.



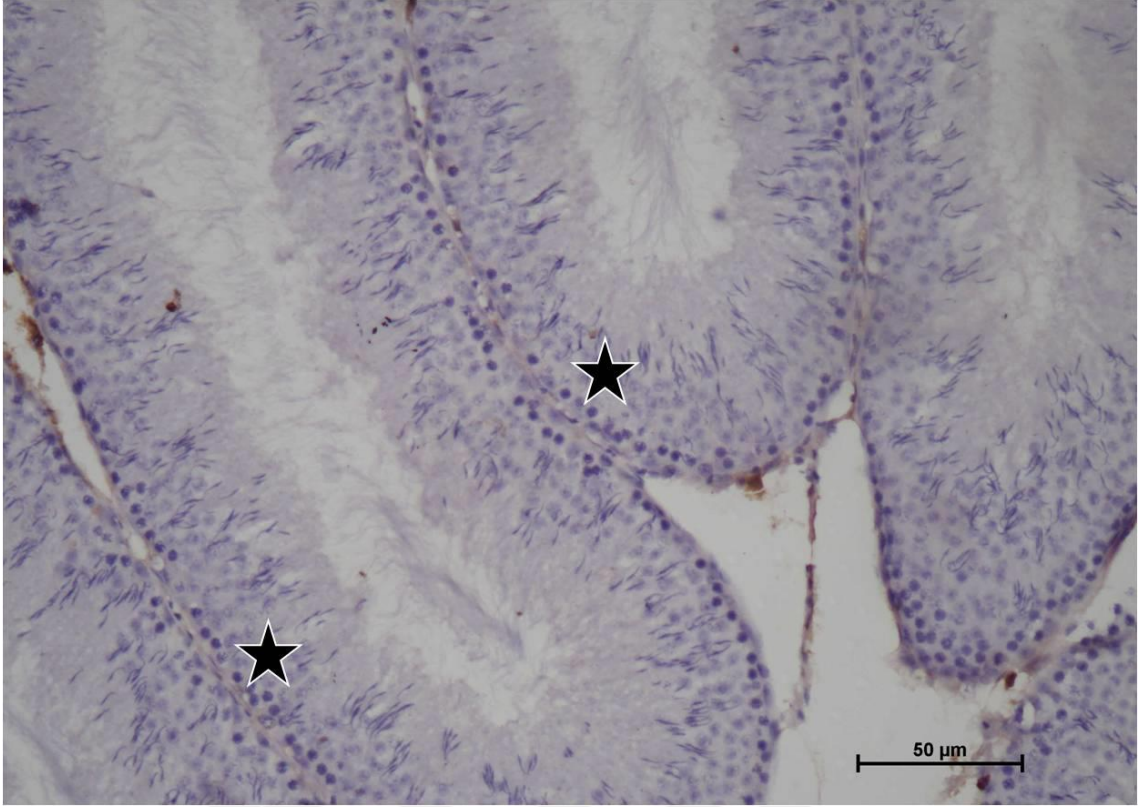
Şekil 4. 25. O grubu. Spermatogonyum (siyah ok), primer spermatosit (beyaz ok), Sertoli hücresi (çift başlı ok), interstisyel doku içinde Leydig hücresi (ok başı). H&E, X40.

PAS boyaması uygulanmış testis kesitlerinde, seminifer tübüllerin bazal membranları K grubundakiyle benzer şekilde tübülleri periferden saracak şekilde düzenli, intakt ve kuvvetli PAS+ boyanmış olarak izlendi. (Şekil 4. 26.).

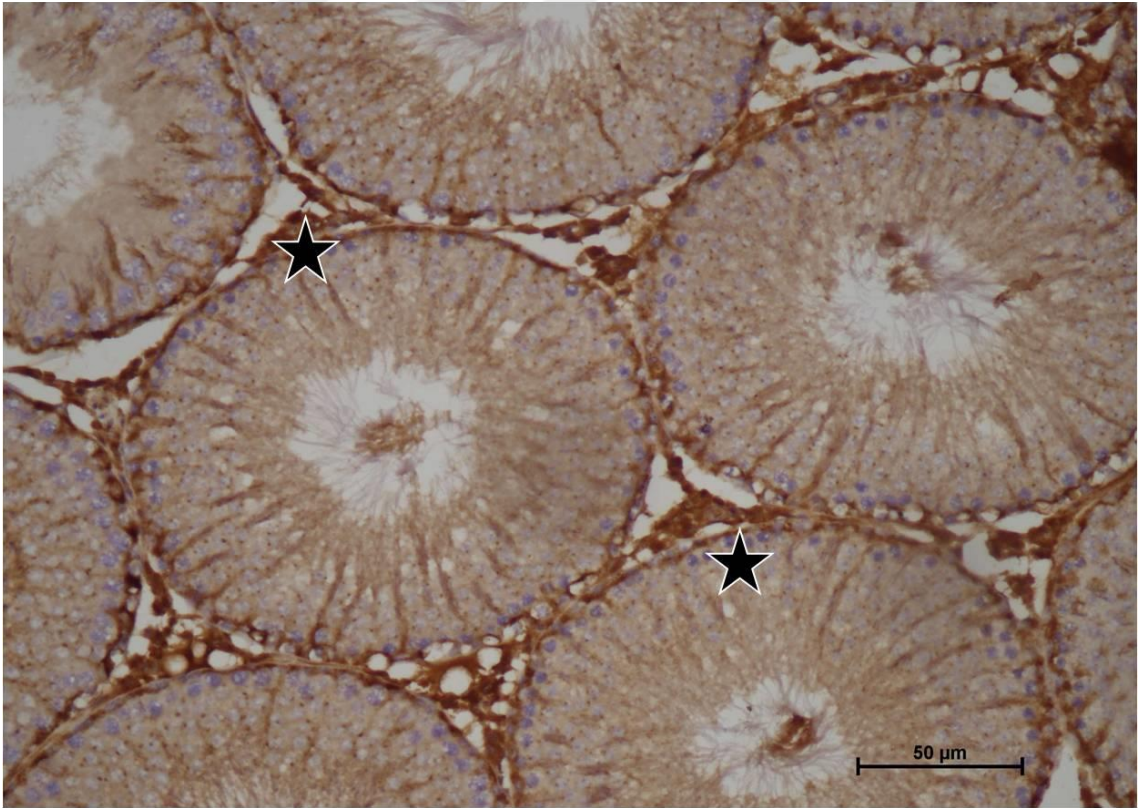


Şekil 4. 26. O grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, X20.

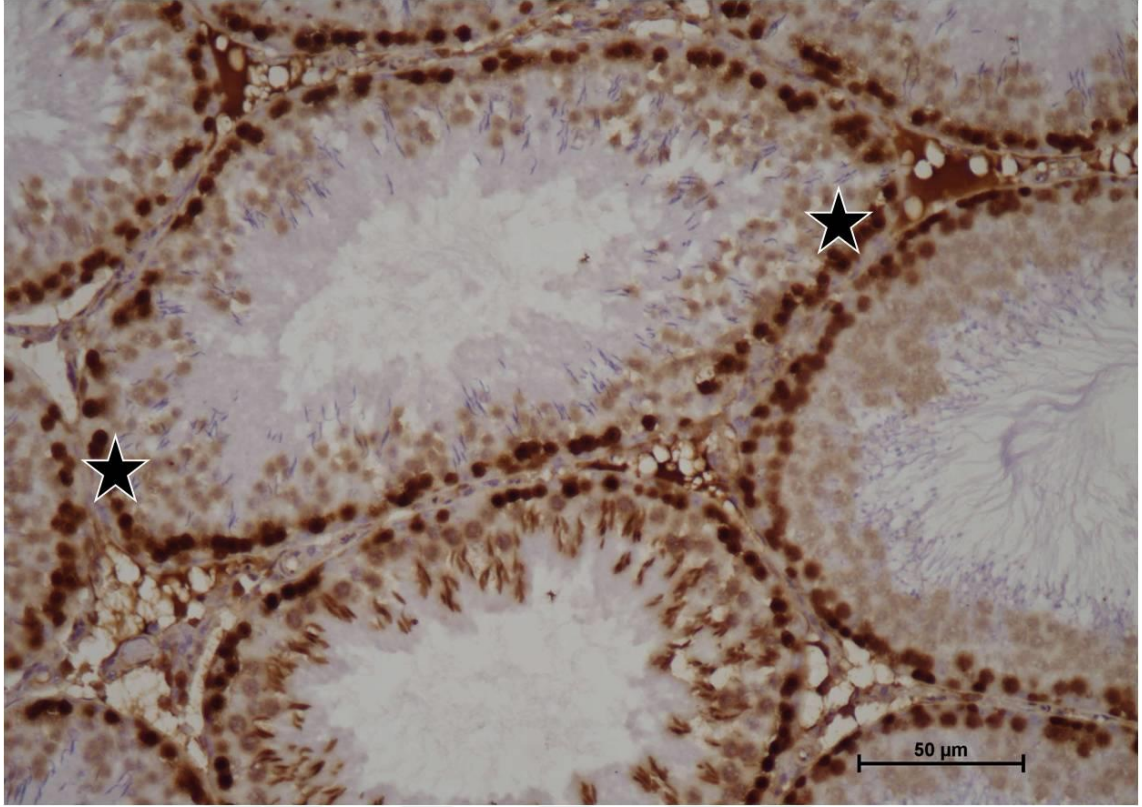
O grubu İmmünohistokimyasal olarak anti-kaspaz uygulanan testis kesitlerinde K grubuyla benzer şekilde pozitif Kas-3 immünreaktivitesi sınırlı alanlarda minimal yoğunlukta saptandı (Şekil 4. 27.). VEGF ve TJP1 immünreaktiviteleri yaygın kuvvetli pozitif düzeyde saptandı (Şekil 4. 28, 29.) (Tablo 4. 6.).



Şekil 4. 27. O grubu. Kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmiyor. (yıldız). IHC, X20.



Şekil 4. 28. O grubu. VEGF immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.



Şekil 4. 29. O grubu. TJP immunreaktivitesi (yıldız). IHC, X20.

4. 4. Histomorfometrik Bulgular

Seminifer tübül çapı, K ve O gruplarında, en yüksek medyan değerlere sahipken, DM'de en düşük medyan değere sahiptir. Ancak, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p=0,131$). Seminifer epitel yüksekliği için de de aynı şekilde K, en yüksek medyan değere sahipken, DM en düşük medyan değere sahiptir. Ancak, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,287$).

Tablo 4. 4. Histomorfometrik ölçüm sonuçları

Grup (n=7)	Seminifer Tübül Çapı (µm)	Seminifer Epitel Yüksekliği (µm)
K	159,94 (148,45-161,7)	42,67 (35,09-45,03)
DM	144,11 (131,78-161,84)	37,74 (33-40,99)
DM+O	148,6 (134,31-158,27)	39,81 (35,96-43,26)
O	150,12 (140,11-162,89)	40,32 (37,09-45,14)
p	0,131	0,287

4. 5. Histopatolojik Bulgular

DM grubunda en yüksek anormal tübül yüzdesi bulunurken, K ve O gruplarında en düşük anormal yapıda tübül oranları gözlenmiştir. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). DM+O grubunda ise ω -3 tedavisi ile DM grubuna göre normal tübüllerin oranı artmış ve anormal yapıdaki tübüllerin oranı ise azalmıştır (Tablo 4. 5.).

Tablo 4. 5. Histopatolojik Tübül Değerlendirme

Grup (n=7)	Normal Tübül	Anormal Tübül
K	82 (74-86) ^a	18 (14-26) ^a
DM	41 (37-53) ^b	59 (47-63) ^b
DM+O	61 (58-68) ^c	39 (32-42) ^c
O	83 (79-86) ^a	17 (14-21) ^a
p	<0,001	<0,001

4. 6. İmmünohistokimyasal Bulgular

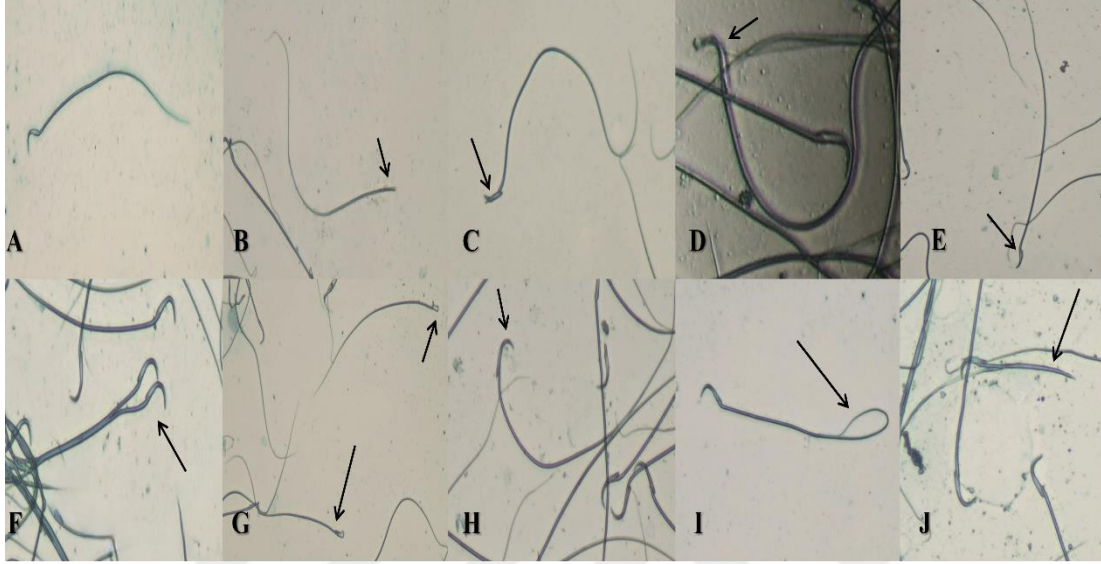
K ve O gruplarında benzer şekilde VEGF ve TJP1 seviyeleri DM grubundakinde yüksek, KAS-3 immünreaktivitesi ise daha düşük düzeyde saptandı. DM grubunda, VEGF ve TJP1 immünreaktivitesi diğer gruplara göre düşük ve KAS-3 immünreaktivitesinin yüksek olduğu belirlendi. DM+O grubunda ise ω -3 uygulaması ile VEGF ve TJP1 immünreaktivite düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ve KAS-3 immünreaktivitesinin de azaldığı saptandı. Tüm gruplar arasında VEGF, KAS-3 ve TJP1 immünreaktivite düzeylerindeki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$) (Tablo 4. 6.).

Tablo 4. 6. İmmünohistokimyasal immünreaktivite düzeyleri.

Grup (n=7)	VEGF	KAS-3	TJP1
K	9 (6-9) ^a	0 (0-1) ^a	6 (4-9) ^a
DM	2 (2-4) ^b	3 (2-6) ^b	2 (1-4) ^b
DM+O	9 (6-9) ^a	0 (0-1) ^a	6 (6-9) ^a
O	9 (6-9) ^a	0 (0-1) ^a	9 (6-9) ^a
p	<0,001	<0,001	<0,001

4. 7. Sperm Morfolojisi

Sıçanlardan elde edilen epididimal sperm örnekleri "Kruger Kriterleri" morfolojik yorumlama yöntemi baz alınarak 100 sperm incelendi. İncelenen 100 sperm, Şekil 4.30'daki gibi normal ve anormal (baş-boyun ve kuyruk anomalileri) olarak sınıflandırılarak her grup için ortalama değer hesaplandı.



Şekil 4. 30. Sperm morfolojisi. A. Normal sperm, B. Başsız sperm, C. Yumru baş, D. İğne baş, E. Çengelsiz baş, F. Çift başlı sperm, G. Amorf baş, H. Bükük boyun, I. Kıvrık kuyruk, J. Kısa kuyruk. Sperm Morphology Kit (FertiPro), X40.

K ve O gruplarında normal sperm yüzdesi yüksek, DM grubunda anormal yapıdaki spermatozonların oranı K, O ve DM+O gruplarındakilerden daha yüksek bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p < 0.001$).

Tablo 4. 7. Sperm morfolojisi

Grup (n=7)	Normal	Anomali
K	82 (73-85) ^a	18 (15-27) ^a
DM	43 (36-49) ^b	57 (51-64) ^b
DM+O	59 (53-64) ^c	41 (36-47) ^c
O	81 (79-84) ^d	19 (16-21) ^d
p	<0,001	<0,001

4. 8. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal Serum Analizleri

K grubu, diğer gruplarla karşılaştırıldığında hem FSH hem de LH seviyeleri açısından en yüksek değerlere sahiptir. Ancak testosteron seviyesinde O grubu en yüksek değere sahiptir. DM grubu, FSH, LH ve T seviyelerinde en düşük değerlere sahiptir. DM+O grubunda FSH, LH ve T seviyeleri DM grubundakine göre daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. O grubu, FSH, LH ve T seviyeleri açısından en yüksek değere sahip gruptur. Gruplar arasındaki hormon düzeylerindeki farklılıkları istatistiksel anlamlıdır ($p < 0,001$).

Tablo 4. 8. Serum hormon seviyelerinin karşılaştırılması.

Grup (n=7)	FSH (IU/mL)	LH (IU/mL)	T (ng/L)
K	6,58 (6,18-6,94) ^a	4,78 (4,62-4,94) ^a	1213,6 (1194,62-1269,62) ^a
DM	3,36 (3,28-4,04) ^b	2,13 (2,03-2,25) ^b	861,73 (834,56-896,11) ^b
DM+O	6 (5,36-6,52) ^c	4,27 (4,01-4,58) ^c	1174,25 (1106,11-1274,72) ^a
O	7,17 (6,92-7,79) ^d	5,35 (4,99-5,7) ^d	1590,19 (1544,23-1614,05) ^c
p	<0,001	<0,001	<0,001

Oksidan-Antioksidan Seviyelerinin Karşılaştırılması

DM grubu, MDA seviyesi açısından en yüksek, GSH, SOD ve KAT seviyeleri açısından en düşük değere sahiptir. O grubunda, en düşük MDA ve en yüksek GSH, SOD ve KAT seviyesi tespit edilmiştir. DM+O grubunda MDA seviyesinin DM grubuna göre azaldığı ancak K ve O grubundakinden daha yüksek olduğu tespit edildi. GSH, SOD ve KAT seviyelerinin DM grubundakine göre DM+O grubunda daha yüksek olduğu tespit edildi. Tüm gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde belirlendi ($p < 0,001$).

Tablo 4. 9. Oksidan-Antioksidan Biyokimyasal Analiz Bulguları

Grup (n=7)	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)	SOD (ü/g protein)	KAT (k/g protein)
K	85,67 (81,45-91,81) ^a	755 (726,67-796,67) ^a	63,98 (60,68-67,99) ^a	8,44 (7,18-8,73) ^a
DM	165,67 (153,25-173,25) ^b	445 (421,67-485) ^b	54,36 (50,7-56,51) ^b	5,94 (5,05-6,48) ^b
DM+O	117,47 (106,39-123,62) ^c	606,67 (540-673,33) ^c	73,36 (68,04-76,64) ^c	9,05 (8,04-9,85) ^c
O	78,08 (72,65-79,64) ^d	965 (940-1000) ^d	86,51 (81,07-97,36) ^d	9,87 (8,51-10,95) ^d
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

5. TARTIŞMA

Günümüzde toplumda DM en yaygın ve önemli sağlık sorunlarından biridir ve prevalansı hızla artmaktadır. 2014 yılında Dünya Sağlık Örgütü, 422 milyon kişinin DM hastası olduğunu bildirmiştir; bu, 2002 yılına göre küresel ölçekte %60'lık bir vaka artışına işaret etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü daha önce bu sayının 2025 yılına kadar yaklaşık 300 milyona çıkacağını tahmin ediyordu ancak DM'nin 2025 yılı için öngörülen değeri 2014'te zaten %28,9 oranında aşmıştır. Son yıllarda, DM'nin erkek üreme fonksiyonu üzerinde önemli etkileri olduğu görüşleri, çeşitli çalışmalardan elde edilen kesin verilerle ortaya konmuştur (123).

Beslenme ve besin takviyelerinin erkek üreme sistemi üzerindeki yadsınamaz etkileri göz önüne alındığında, günümüzde sperm kalitesini artırmak ve infertiliteyi tedavi etmek için beslenme alışkanlıklarına büyük önem verilmektedir (124). ω -3 çoklu doymamış yağ asitleri, üreme fizyolojisi dahil birçok fizyolojik süreç için gerekli moleküllerdir ancak insan vücudu bu yağ asitlerini yeni baştan sentezleyemez (125, 126). Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar, diyetteki yağ asitlerinin erkek üreme sistemi ve infertilite üzerindeki etkisini incelemiştir. DM'nin erkek üreme fonksiyonu üzerindeki ana patofizyolojisinin, ROS üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan oksidatif stres ve buna bağlı olarak da gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) üretiminin artması olduğu bilinmektedir (127). Bu çalışmada, deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanların testislerinde oluşan hasara karşı antioksidan özelliği olduğu bilinen ω -3'ün koruyucu ve iyileştirici etkisi araştırılmıştır.

Alloksan ve STZ, diyabet indüklemek için en sık kullanılan kimyasallardır. Her ikisi de sitotoksik glukoz analoglarıdır. Sitotoksiteleri farklı yollarla elde edilse de beta hücre seçici etki mekanizmaları aynıdır. Alloksan enjeksiyonundan birkaç dakika sonra 30 dakikaya kadar süren ilk geçici hipoglisemi fazı başlar. Bu kısa süreli hipoglisemi tepkisi, insülin salgılanmasının geçici olarak uyarılmasının sonucudur. Altta yatan mekanizma, glukokinaz inhibisyonu yoluyla glikoz fosforilasyonunun blokajı nedeniyle geçici olarak azaltılmış bir tüketim ve artan ATP varlığıdır. STZ glukokinazı inhibe etmediğinden, bu ilk geçici hipoglisemi fazı STZ enjeksiyonuna yanıt olarak gözlenmez. Bu faz sırasında morfolojik değişiklikler minimaldir. İkinci faz, toksinlerin uygulanmasından bir saat sonra kan glukoz konsantrasyonunda artış ve plazma

insülininde azalma ile başlar. Genellikle 2-4 saat süren bu ilk hiperglisemi fazı, hipoinsülinemiye yol açan insülin salgılanmasının inhibisyonundan kaynaklanır. Bu faz sırasında beta hücreleri, hücre içi vakuolizasyon, pürüzlü endoplazmik retikulumun genişlemesi, Golgi alanının azalması, salgı granüllerinin ve insülin içeriğinin azalması ve şişmiş mitokondriler gibi ultrastrüktürel düzeyde morfolojik değişiklikler gösterir. Üçüncü faz, yine bir hipoglisemik fazdır ve tipik olarak toksinlerin enjeksiyonundan 4-8 saat sonra meydana gelir ve birkaç saat sürer. O kadar şiddetli olabilir ki konvülsiyonlara neden olabilir ve hatta açlık nedeniyle karaciğer glikojen depoları tükendiğinde glikoz verilmediğinde ölümcül olabilir. Bu şiddetli geçiş hipoglisemisi, toksin kaynaklı salgı granülü ve hücre zarı yırtılması sonucu dolaşımın insülinle dolmasıyla oluşur. Pankreatektomi bu fazı önler. Birinci fazda görülen morfolojik değişikliklere ek olarak, beta hücre çekirdekleri piknotiktir ve bu değişiklikler geri döndürülemezdir. Dördüncü faz kalıcı diyabetik hiperglisemik fazdır. Morfolojik olarak, tam degranülasyon ve beta hücre bütünlüğünün kaybı 12-48 saat içinde görülür. Beta olmayan hücreler sağlam kalır ve toksik etkinin beta hücre seçici karakterini gösterir. Ölen beta hücrelerinden kaynaklanan hücre artıkları aktive olmayan süpürücü makrofajlar tarafından temizlenir (83). Bu nedenle, alloksan ve STZ enjeksiyonları esas olarak aynı kan glukozu ve plazma insülin tepkilerini indükler ve insüline bağımlı tip 1 benzeri diyabet sendromuna neden olur. Beta hücre yıkımının açıklanan tüm morfolojik özellikleri nekrotik hücre ölümünün karakteristiğidir. Bu mekanizma hem insanlarda hem de hastalığın kemirgen modellerinde, beta hücre ölümünün, yırtılmış salgı granüllerinden insülin sızıntısı olmaksızın apoptotik hücre ölümünün sonucu olduğu otoimmün tip 1 diyabetin altında yatan mekanizmayla açıkça çelişmektedir (128). Edo ve ark. sıçanlarda DM indüklemek için 60 mg/kg alloksan (129), Khavarimehr ve ark. ise 40 mg/kg STZ (24) kullanmışlardır. Biz de çalışmamızda, tek doz 50 mg/kg STZ uygulayarak 96. Saat sonunda kan-glukoz seviyeleri en az iki katına çıkan sıçanlar DM'li kabul edildi ve DM grubundaki sıçanlarda deney sonuna kadar hiperglisemi izlendi. 42 günlük deney sonunda kan-glukoz düzeylerinin 1. gün, 14. gün, 28. gün ve 42. gün itibarıyla DM grubuyla diğer gruplar arasında artış yönünde anlamlı farklar bulundu ($p < 0,001$). K, DM ve DM+O gruplarındaki sıçanların kan-glukoz seviyesi, zaman içinde ölçümlerde anlamlı değişiklik göstermedi. ω -3 grubunda zaman içinde ölçümlerde anlamlı değişiklikler gözlemlendi ($p = 0,025$). Sonuç olarak, bu veriler, gruplar arasındaki ve zaman içindeki kan glukoz seviyelerindeki değişiklikleri ortaya koymakta ve belirli zaman noktalarında anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir. DM ve DM+O gruplarının yüksek glukoz

seviyeleri, diyabetin etkisini ve ω -3 tedavisinin etkinliğini vurgulamaktadır. İnsülinin varlığı, glukoz taşıyıcılarının (GLUT'ler) uyarılmasına neden olur, glukozun bu taşıyıcıların hücre dışı kısmına bağlanmasına izin verir, bu da proteinin translokasyonu ile sonuçlanır, böylece hücreye hızlı glukoz difüzyonu sağlanır. DM'de azalan insüline bağlı olarak, glukoz metabolizması ve kullanım süreçlerinde düzensizlik vardır ve bu da insülinin glukoz taşıyıcı translokasyonu üzerindeki uyarıcı etkisini eş zamanlı olarak değiştirir (130,131). Khavarimehr ve ark. çalışmalarında, 300 mg/kg ve 600 mg/kg ω -3 uygulamasıyla kan-glukoz değerlerinin DM grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir (24). Biz de bu sonuçlarla uyumlu olarak 500 mg/kg ω -3 takviyesinin hiperglisemik durumu azalttığını bulguladık.

Glukoz taşıyıcısı GLUT-2 aracılığıyla STZ beta hücrelerine nüfuz eder ve DNA iskeletindeki fosfatlara metil-etil gruplarının bağlanması olan DNA alkilasyonunu tetikler. ADP-ribosilasyonunun aktivasyonu DNA'daki bu hasardan kaynaklanır. Bu DNA hasarı hücresel NAD ve ATP'nin parçalanmasıyla ve Poli ADP-ribosilasyonuyla sonuçlanır (DNA hasarının tespitinde ve onarımında rol oynar; enzimi PARP, substrat olarak NAD'a ihtiyaç duyar). Süperoksit radikalleri ($O^{\cdot-}$), ksantin oksidazın artan ATP defosforilasyonu nedeniyle bir substrata sahip olması durumunda oluşur. Daha sonra, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilir. SOD, süperoksit radikalleri H_2O_2 'ye dönüştürür (132). ω -3 PUFA'ların STZ'nin yol açtığı hiperglisemiye regüle ettiği aynı zamanda DM'li hastalarda ω -3'ün plazma lipid spektrumu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu ve insülin duyarlılığını artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (133). Deneysel DM modeli oluşturulan bazı çalışmalarda, DM'li sıçanların vücut ağırlıklarının kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (134–136). Ancak yapılan bazı çalışmalarda, tam tersi olarak DM'li sıçanların vücut ağırlıkları K gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (110, 137). Aminzadeh ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, DM grubunun K grubuna kıyasla vücut ağırlıklarının anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (110). Hasan ve ark. yapmış oldukları çalışmada, DM'ye bağlı olarak artan sıçan vücut ağırlıklarının ω -3 uygulamasıyla azaldığı bildirilmiştir (137). Yaptığımız çalışmada, tüm gruplarda 42 günlük deney süresi sonunda deney başlangıcına göre vücut ağırlıklarının literatürde bildirildiği şekilde artmıştır. Ancak deney başlangıcı ve sonu arasındaki vücut ağırlıkları değişim oranlarının K (56 gr) ve O (56 gr) gruplarında benzer, DM (42 gr) grubunda ise K ve O gruplarına göre azalmıştır. DM+O (65 gr) grubu ise K, DM ve O gruplarındakine göre artmıştır. DM grubundaki sıçanların, deney süresi boyunca artmış olmasına rağmen deney başlangıcı ve

sonu arasındaki vücut ağırlığı artış oranı diğer gruplara göre daha düşüktür. ω -3'ün kilo kaybı etkisi gösterdiği mekanizma, yağ dokusuna triasilgliserol tedarikini azaltan ve yağ dokusunda lipid birikimini önleyen çok düşük yoğunluklu lipoprotein sentezindeki azalmadır (138).

Al-Roujeaie ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, DM grubunda K grubuna göre testislerde küçülme rapor edilmiştir (139). Çalışmamızda, K, DM ve DM+O gruplarında testis ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. ω -3 grubunda diğer gruplara kıyasla testis ağırlığında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Yine Al-Roujeaie ve ark. tarafından yapılan aynı çalışmada DM oluşturulan gruptaki sıçanlara ait seminifer tübüllerin çapında ve seminifer epitel yüksekliğinde kayda değer bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak Al-Roujeaie ve ark.'nın aksine çalışmamızın sonuçları, seminifer tübül çapı ve seminifer epitel yüksekliği açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Bu, DM'nin ve ω -3'ün uyguladığımız doz ve sürelerde bu parametreler üzerinde belirgin bir etkisi olmadığına işaret etmektedir.

Yapılan çalışmalarda, diyabetik sıçanların testislerindeki germinal hücrelerde dejenerasyon, düzensizlik ve interstisyel ödem dahil olmak üzere anormal değişiklikler bildirilmiştir (140, 141). Çalışmamızda, DM grubunda en yüksek anormal tübül yüzdesi bulunurken, K ve O gruplarında en düşük anormal tübül oranları gözlemlenmiştir. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). DM+O grubunda ω -3 etkisi ile, normal tübüllerin oranı artmış ve anormal tübüllerin oranı azalmıştır. K ve O'da ise normal tübüllerin oranı yüksek, anormal tübüllerin oranı düşüktür. Bu bulgular, ω -3 tedavisinin tübül yapıyı olumlu etkileyebileceğini, hipergliseminin sebep olduğu testiküler hasarları ortadan kaldırarak üreme sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin olabileceğini ortaya koymaktadır.

DM, ROS'un aşırı üretimi ve antioksidan savunmaların azalması nedeniyle artan oksidatif strese yol açar. Bu oksidatif stres, sperm DNA'sına, lipitlerine ve proteinlerine zarar vererek sperm fonksiyonunu bozar (142). Altamimi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, DM modeli oluşturulmuş sıçanlarda, kontrol grubundaki sıçanlara kıyasla, kuyruksuz, başsız, kıvrık boyunlu ve kıvrık kuyruklu sperm sayısında artış gözlemlenmiştir. (143). Çalışmamızda, DM'nin sperm morfolojisi üzerine olumsuz etkisi belirgin şekilde gözlemlenmiştir. DM grubundaki sıçanlara ait sperm morfoloji analizlerinde baş, boyun, kuyruk anomalisi bulunan spermelerin sayısı K grubundakinden yüksek bulunmuştur. DM grubunun normal sperm morfolojisi yüzdesi açısından en düşük, morfolojik anomalili sperm yüzdesi açısından ise en yüksek değerlere sahipti. DM+O grubu ω -3 tedavisi

sonrası, DM grubuna göre normal hücre yüzdesinde artış ve anomali yüzdesinde azalma gözlemlendi, ancak yine de K ve O gruplarının seviyesine ulaşamamıştır. Bu, sperm morfolojisinin korunması üzerine ω -3'ün kısmen etkili olduğunu, ancak tam bir iyileşme sağlamadığını göstermektedir. Ek olarak, yüksek derecede güçlü serbest radikallerin üretiminin artması ve bunu takip eden AGE'lerin üretiminin yanı sıra, DM'de AGE reseptörünün ekspresyonunda bir artış da rapor edilmiştir (127). Mevcut araştırmalara göre DM'nin erkek üreme potansiyelini azaltan bir takım klinik ve fizyolojik değişikliklere neden olduğu açıktır (144).

ω -3, hücre zarında bol miktarda bulunması nedeniyle ve özellikle DHA'ya bağlı olan sperm hareketliliği ve canlılığı başta olmak üzere birçok fizyolojik aktivitede önemli rol oynamaktadır (145). Sperm membranında azalan DHA, sperm zarı akışkanlığının, hareketliliğinin ve dölleme kapasitesinin azalmasına neden olabilir (146). Ayrıca ω -3'ün, sitoprotektif, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri sayesinde testis dokusunun DM'nin zararlı etkilerinden korunmasında önemli rol alması muhtemeldir (125). ω -3, bu etkileri sayesinde erkek üreme sisteminde, DM'ye bağlı gelişen tübüler farklılaşmanın ve spermatogenez endekslerinin iyileşmesine, tübüler atrofinin azalmasına ve germ hücrelerinin ayrışmasının engellenmesine yardımcı olmaktadır.

Sağlıklı testis dokusu, kendiliğinden apoptozis sürecinde hasarlı veya anormal germ hücrelerini ortadan kaldırır. Ancak diyabetik sıçanlarda, oksidatif strese bağlı olabilecek apoptotik germ hücre sayısında artış gözlenmektedir (40). Bayram ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, ROS nedeniyle artan sperm hasarı ile erkek faktörlü kısırlık diyabetinde apoptozun göstergesi olan daha yüksek sitokrom c, kaspaz 9 ve 3 seviyeleri arasındaki korelasyon gösterilmiştir (147). Çalışmamızın bulgularına göre, KAS-3 immünreaktivite düzeyi incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$). DM grubu, diğer üç gruba göre daha yüksek KAS-3 immünreaktivitesine sahiptir. Dolayısıyla, DM'nin mitokondriyal bozulma ve sitokrom c enziminin salınımıyla birlikte apoptotik hücre ölümlerine sebep olduğu ve ω -3'ün bu aşırı apoptozis durumunu iyileştirdiği saptanmıştır.

Anjiyogenez, vaskülojenezin erken aşamasında önceden var olan damarlar için yeni kan damarlarının olduğu fizyolojik süreçtir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), önceden var olan damarların (anjiyogenez) veya yeni damarların (vaskülojenez) büyümesini uyaran yeni kan damarlarının oluşumuna önemli bir katkıda bulunur ve bu nedenle embriyonik gelişim ve damar onarımı için anahtardır (148, 149). Diyabetin anjiyojenik paradoksa yol açtığı gösterilmiştir: hem diyabetik retinopatide ve kronik

travmada artmış VEGF hem de diyabetik kardiyomiyopatide azalmış VEGF ve bozulmuş kollateral damar büyüme anjiyogenezi ile ilişkilidir (150). Çalışmalar, VEGF'nin bölgesel dolaşımdaki normal kan akışını sürdürerek testislerde önemli bir düzenleyici role sahip olduğunu ileri sürmektedir ve diyabetik sıçanların testislerindeki VEGF düzeyinin, artan apoptoz ve testis hasarıyla birlikte normalden daha düşük olduğunu göstermiştir. VEGF'deki bu azalmanın, diyabette erkek üreme sistemi işlev bozukluğunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (151). Long ve ark., hipergliseminin mikro dolaşım hasarlarına neden olduğunu ve testis yapısının deforme olduğunu göstermiştir (152). Ayrıca testiküler sertoli hücrelerinin, endotelial hücre göçünü ve proliferasyonunu tetikleyen en yüksek VEGF seviyelerini ürettiği doğrulanmıştır (153). Long ve ark., aynı zamanda testiküler sertoli hücrelerinin diyabetik koşullarda canlılığının azaldığını ve ardından VEGF üretiminin azaldığını bildirmiştir. Ayrıca çalışma, kan dolaşımındaki fonksiyon bozukluğunun, spontan vazomotionun kaybolmasını içerdiğini ve diyabetik sıçanlarda vasküler alan veya yoğunlukta bir azalmanın görülebileceğini göstermiştir. Diyabetik durumlardaki oksidatif stres mikrovasküler sistemi etkileyerek vaskülopatiyeye yol açmaktadır. Dolayısıyla damar yapılarının hasar görmesi kan desteğinin yetersizliğine neden olur ve sonuçta gözler, sinirler ve testis gibi farklı organlara zarar verir (152). ω -3'ün damar yapıları üzerindeki olumlu etkileri kanıtlanmıştır. Çalışmamızda, VEGF immünreaktivitesi incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). DM grubunun, diğer üç gruba göre daha düşük VEGF ekspresyonu seviyelerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, DM'nin sebep olduğu vasküler hasara karşı ω -3'ün, anjiyogeneze ve vaskülogenez üzerindeki onarıcı etkisini göstermektedir.

Testislerde glikoz metabolizması hayati öneme sahip bir süreçtir. Ayrıca, spermatogenezin in vivo sürdürülmesi glukoz metabolizmasına bağlıdır, ancak glukoz tübüler sıvıda düşük seviyede bulunur (154). Sonuç olarak, BTB'nin varlığı, glikozun ve diğer metabolik ara maddelerin kandan germ hücrelerine taşınmasını önemli ölçüde kontrol eder. Bu nedenle, glikozun ve diğer metabolik ara maddelerin kandan germ hücrelerine taşınması, özellikle BTB'nin varlığı nedeniyle yüksek düzeyde kontrol edilir. Bu bariyer seminifer epiteli fiziksel olarak iki bölmeye ayırmakla kalmaz, aynı zamanda rete testis sıvısı ile lenf veya plazma arasında farklı seviyelerde madde ve metabolitlerin korunmasından da sorumludur (155). BTB'nin tüm fonksiyonlarıyla ilgili testis hücrelerinden biri Sertoli hücresidir. Bu hücrelerin erkek üreme fonksiyonu üzerinde o kadar önemli bir rolü vardır ki sayıları genellikle testis boyutuyla ilişkilidir. Seminifer

sıvının interstisyel boşluktan lümene taşınmasında görev alırlar. Aynı zamanda, seminifer sıvının pH'ını ve iyonik bileşimini de kontrol ederler (156).

Anatomik olarak, BTB Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bir sonucudur. Bu sertoli hücreleri birbirlerine TJP1 proteinleri ile bağlanırlar. BTB'nin yapısının bozulması, üreme sisteminin zarar görmesinin ilk adımıdır. Okludin, ZO-1 ve Claudin-11, BTB'nin bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynayan TJ'deki integral membran proteinleridir. Yapılan çalışmalar, DM'de, oksidatif stresin sonucu olarak artan ROS birikiminin, apoptozisde önemli bir yolak olan JNK yolağını aktive ettiğini göstermektedir. Bu yolağın aktivasyonu ise TJ protein yapılarının bozulmasına yol açmaktadır (141). Yaptığımız çalışmada, DM, diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük TJP1 immünreaktivitesine sahipti. DM+O ve O grupları, K grubu ile benzer TJP1 immünreaktivitesine sahiptir. Bu sonuçlar, DM'nin BTB üzerinde verdiği hücre hasara karşı ω -3'ün önemli bir iyileştirici etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Hipotalamus normalde GnRH salgılar. Bu, ön hipofizi FSH ve LH salgılaması için uyarır. FSH, spermatogenez sürecine yardımcı olmak için seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerini uyarırken, LH, Leydig hücrelerini T salgılaması için uyarır. Spermatozoa glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu kullanarak enerji üretir. Enerji üretmek için dışarıdan gelen heksozları (glukoz, fruktoz ve mannoz gibi) ve daha küçük substratları (laktat, sitrat amino asitleri ve lipitler gibi) kullanırlar. Spermatozoa, kendi insülinini salgılar ancak hormonal değişikliklerden etkilenir. Bu nedenle DM'de insülin eksikliği veya insüline duyarsızlık, endokrin yolunu (negatif geri besleme mekanizması) değiştirerek erkek üreme fonksiyonunun bozulmasına neden olur (123).

Çeşitli çalışmalar, DM'nin HPG eksenindeki etkisinin DM'nin türüne bağlı olmadığını, tüm DM modellerinde benzer sonuçlar gösterdiğini göstermiştir. Başka herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan toplam 72 diyabetik kadınla (yaş ortalaması 38.8) yapılan bir çalışmada, HPG ekseninin DM tarafından önemli ölçüde baskılandığı ve dolayısıyla FSH ve LH hormon seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (157). 21 erkek (25-65 yaş) yapılan başka bir çalışmada DM'de testosteronun sınırlı salgılanması sebebiyle Leydig hücrelerinin fonksiyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (158). Hayvan modelleriyle yapılan birçok çalışmada da aynı şekilde DM'nin FSH, LH ve T hormon konsantrasyonlarında önemli bir azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (67, 159, 160). Çalışmamızda bu sonuçlara paralel hormon seviyeleri gözlemledik. K, diğer gruplarla karşılaştırıldığında hem FSH hem de LH seviyelerinde en yüksek değerlere sahipti. Ancak T seviyesinde O grubunun en yüksek değere sahip olduğu gözlemlendi. DM

grubu hem FSH hem de LH seviyelerinde en düşük değerlere, T seviyesinde ise en düşük değere sahip gruptu. DM+O, FSH ve LH seviyelerinde orta düzeyde değerlere sahipken, T seviyesi açısından K grubuyla benzerlik gösterdi. O grubu, FSH, LH ve T seviyelerinde en yüksek değerlere sahipti. Dolayısıyla sonuçlarımız, DM'nin HPG eksenine etkisini destekleyici niteliktedir. ω -3 takviyesi verilen grupta ise hormon seviyelerinin K grubuna yakın değerler sergilediği yani DM'nin sebep olduğu hormonal düşüşü ω -3'ün anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi.

Testisteki antioksidan mekanizma, testisteki iki temel olayın yani spermatogenez ve steroidogenezin oksidatif stres tarafından olumsuz yönde değişmemesine neden olmaktadır. Testiste bulunan bu antioksidanlar, günümüzde diyabet dahil çok çeşitli durumların patolojik reaksiyonunu gizleyen testis fonksiyon bozukluğunun ana kaynağı olarak değerlendirilen oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Testiste bulunan bu antioksidanlar, testis fonksiyon bozukluğunun ana kaynağı olarak değerlendirilen oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, hem Tip 1 DM hem de Tip 2 DM hayvan modellerinde antioksidan enzimlerde dikkate değer bir düşüş ve testis lipid peroksidasyonunda bir artış dikkat çekmektedir. STZ ile indüklenen sıçanlarının kullanıldığı çalışmalar, SOD, KAT ve GSH aktiviteleri gibi antioksidan enzimlerde kayda değer bir düşüş ve lipid peroksidasyon belirteci olan MDA seviyesinde dikkate değer bir artış olduğunu göstermiştir (158, 161). Gobbo ve ark. tarafından yapılan STZ ile indüklenen Tip 1 DM sıçanlarının kullanıldığı başka bir çalışmada ise testiküler SOD, CAT, GSH ve MDA aktivitelerinde 1 ve 8 hafta sonra bile kayda değer bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (162). Mevcut çalışmamızda, SOD, KAT, GSH ve MDA seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi ($p < 0,001$). Sonuçlarımıza göre, DM grubu, MDA seviyelerinde en yüksek değerlere sahiptir ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak DM grubunda en fazla olduğu görülmektedir. DM, en düşük GSH, SOD ve KAT seviyelerine sahiptir. O grubu, en düşük MDA, en yüksek GSH, SOD ve KAT seviyelerine sahiptir. Bu da ω -3'ün antioksidan kapasiteyi arttırdığını, oksidatif strese karşı savunma mekanizmasını güçlendirdiğini ve hücrel koruma mekanizmalarını aktive edebildiğini göstermektedir. DM+O grubundaki oksidan ve antioksidan seviyeleri K grubuna benzerlik gösterdi. Bu sonuçlar, ω -3'ün DM'nin sebep olduğu oksidatif stresin etkilerini iyileştirdiği sonucunu ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, DM'nin erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu ve bu etkilerin beslenme müdahaleleriyle kısmen hafifletilebileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle ω -3 PUFA'ların, diyabetin testis dokusuna ve sperm kalitesine olan zararlarını azaltmada etkili olduğu belirlenmiştir. DM grubundaki sıçanlarda sperm morfolojisi ve tübüler yapıdaki anormallikler belirgin şekilde yüksekken, ω -3 uygulanan grupta bu anormalliklerin azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak, ω -3 tedavisinin DM'nin tüm olumsuz etkilerini tamamen ortadan kaldırmadığı da gözlemlendi. Ayrıca, DM'nin hiperglisemiye neden olarak insülinin glukoz taşıyıcılarını uyarma yeteneğini bozduğu, bu durumun da sperm fonksiyonunu olumsuz etkilediği anlaşılmıştır.

Diyabetin sebep olduğu oksidatif stres, üreme sağlığı üzerinde yıkıcı etkiler yaratmaktadır. Oksidatif stres, ROS'un aşırı üretimi ve antioksidan savunmaların azalması sonucu ortaya çıkar. Bu durum, hücre zarlarına, proteinlere ve DNA'ya zarar verir. Antioksidanlar, bu zararlı etkileri nötralize eden ve hücrelerin oksidatif stresten korunmasını sağlayan moleküllerdir. Çalışmamızda, DM grubundaki sıçanlarda belirgin bir oksidatif stres artışı gözlemlenmiş, bu da sperm kalitesinde ve testis dokusunda bozulmalara neden olmuştur. Antioksidan savunması SOD, KAT ve GSH gibi enzimler tarafından sağlanır. Bu enzimler, ROS'u nötralize ederek hücreleri korur. Ancak DM grubundaki sıçanlarda, bu enzimlerin seviyelerinde belirgin bir düşüş görülmüştür. Ayrıca, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA seviyeleri DM grubunda artmıştır. ω -3 takviyesi yapılan DM+O grubunda ise, antioksidan enzim seviyelerinde artış ve MDA seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ω -3 yağ asitlerinin antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek oksidatif stresi azalttığını göstermektedir.

Çalışmamızda hormon seviyeleri incelendiğinde, HPG ekseninde önemli bozulmalara yol açtığı gözlemlenmiştir. K grubuna kıyasla DM grubunda FSH, LH ve T seviyelerinde belirgin düşüşler tespit edilmiştir. Bu bulgu, DM'nin üreme hormonlarının salınımını baskıladığını ve HPG eksenini üzerinde olumsuz etkiler yarattığını göstermektedir. ω -3 uygulamasının DM+O grubunda ise hormon seviyelerinde iyileşme görülmüştür.

Çalışmamızın bulguları, omega-3 uygulamasının DM'nin testis dokusu üzerindeki

olumsuz etkilerini azaltabileceğini ve bu yağ asitlerinin diyabetik bireylerde üreme sağlığını korumada potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Ancak, daha geniş ölçekli ve uzun süreli çalışmalarla bu bulguların doğrulanması ve omega-3'ün etkinliğinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Lazarev VF, Guzhova IV, Margulis BA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a multifaceted therapeutic target. *Pharmaceutics*. 2020; 12(5): 416.
2. Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero A. Diabetes Mellitus and sperm parameters. *J Androl*. 2011;33(2):145-53.
3. American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37(1):81-90.
4. Derkach KV, Bakhtyukov AA, Romanova IV, Zorina II, Bayunova LV, Bondareva VM, et al. The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. *Andrologia*. 2020;52(11):13816.
5. Yaghoubi A, Shahedi A, Akbari H, Nematollahi-Mahani SN. Do insulin replacement and omega3 protect the male reproductive function of the streptozotocin-induced diabetic mice? *J Nutr Metab*. 2017: 6102985
6. Gómez O, Ballester B, Romero A, Arnal E, Almansa I, Miranda M, et al. Expression and regulation of insulin and the glucose transporter glut8 in the testes of diabetic rats. *Hormone and Metabolic Research*. 2009: 41(5), 343-49.
7. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2018;9, 345-81.
8. Phang M, Garg M, Sinclair A. Inhibition of platelet aggregation by omega-3 polyunsaturated fatty acids is gender specific-redefining platelet response to fish oils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;81, 35-40.
9. Gotoh N, Nagao K, Onoda S, Shirouchi B, Furuya K, Nagai T, et al. Effects of three different highly purified n-3 series highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in c57bl/ksj-db/db mice. *J Agric Food Chem*. 2009: 57(22):11047-54.
10. Lorente-Cebrián S, Bustos M, Marti A, Alfredo M, Moreno-Aliaga M. Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and

- increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. Clin Sci (Lond). 2009; 117:243-9.
11. Mustad V, Demichele S, Huang YS, Mika A, Lubbers N, Berthiaume N, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids have differential effects on metabolic control and vascular reactivity in the ob/ob mouse model of type 2 DM and insulin resistance. Metabolism: clinical and experimental. 2006;55(10), 1365-74.
 12. Liu Q, Zhou Y, Duan R, Wei HK, Jiang S, Peng J. Lower dietary n-6:n-3 ratio and high-dose Vitamin E supplementation improve sperm morphology and oxidative stress in boars. Reprod Fertil Dev. 2016;29(5), 940-49.
 13. Feng Y, Ding Y, Liu J, Tian Y, Yang Y, Guan S, et al. Effects of dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in the young breeder rooster. BMC Vet Res. 2015;11, 73.
 14. Qazi A, Shaikh D. Ameliorating effects of omega-3 fatty acids on underlying mechanisms of type 2 diabetes. J Pharm Res Int. 2019;31(6), 1-7.
 15. Ross MH, Wojciech P. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, Baykal B. (Çeviri editörü). Ankara, Palme Yayıncılık, 2014:784-813.
 16. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology 5th ed. Livingstone, an imprint of Elsevier Inc. 2015:14-36
 17. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji, Başaklar AC. (Çeviri editörü). Ankara, Palme Yayıncılık, 2005:328-37
 18. Garcia RA, Sajjad H. Anatomy, abdomen and pelvis, scrotum. StatPearls Publishing, 2023: <http://europepmc.org/books/NBK549893> Son Erişim Tarihi: 13 Mart 2024
 19. Suede S, Malik A, Sapra A. Histology, Spermatogenesis. StatPearls Publishing, 2024: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553142/> Son Erişim Tarihi: 13 Mart 2024
 20. Hess R, França L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Advances in experimental medicine and biology. 2008;636, 1-15.
 21. Kumar N, Singh AK. The Anatomy, movement and functions of human sperm tail: An evolving mystery. Biol Reprod. 2020;104(3), 508-520

22. American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010;33(1), 62-9.
23. Hill MA, Yang Y, Zhang L, Sun Z, Jia G, Parrish AR, et al. Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2021;119, 154766.
24. Khavarimehr M, Nejati V, Razi M, Najafi G. Ameliorative effect of omega-3 on spermatogenesis, testicular antioxidant status and preimplantation embryo development in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(9), 1545-60.
25. Ojo OA, Ibrahim HS, Rotimi DE, Ogunlakin AD, Ojo AB. Diabetes mellitus: From molecular mechanism to pathophysiology and pharmacology. *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2023:100247
26. Dimeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Seminar Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138),2449-62.
27. American Diabetes Association; Standards of Medical Care in Diabetes-2022 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes*. 2022;40(1), 10-38.
28. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17), 6275.
29. Kyrou I, Tsigos C, Mavrogianni C, Cardon G, Van Stappen V, Latomme J, et al. Sociodemographic and lifestyle-related risk factors for identifying vulnerable groups for type 2 diabetes: A narrative review with emphasis on data from Europe. *BMC Endocr Disord*. 2020;20(1),134.
30. Bailey CJ, Day C. Treatment of type 2 diabetes: future approaches. *Br Med Bull*. 2018;126(1), 123-37.
31. Li G, Wei T, Ni W, Zhang A, Zhang J, Xing Y, et al. Incidence and risk factors of gestational diabetes mellitus: A prospective cohort study in Qingdao, China. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11, 63611.
32. Šimják P, Cinkajzlová A, Anderlová K, et al. The role of obesity and adipose tissue dysfunction in gestational diabetes mellitus. *J Endocrinol*. 2018;238(2), 63-77.
33. Oskovi-Kaplan ZA, Ozgu-Erdinc AS. Management of gestational diabetes mellitus. *Diabetes: from Research to Clinical Practice*. 2020;1307(4).

34. Zahoor I, Singh S, Behl T, Sharma N, Naved T, Subramaniyan V, et al. Emergence of microneedles as a potential therapeutics in diabetes mellitus. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29(3),3302-22.
35. Banday MZ, Sameer AS, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J Med*. 2020;10(4), 174-188.
36. Schoeller EL, Schon S, Moley KH. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. *Cell Tissue Res*. 2012;349(3), 839-847.
37. Lei ZM, Mishra S, Ponnuru P, Li X, Yang ZW, Rao ChV. Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy. *Biol Reprod*. 2004;71(5),1605-13.
38. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289(5487),2122-25.
39. Ghanbari E, Nejati V, Najafi G, Khazaei M, Babaei M. Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Fertil Steril*. 2015;9(1), 113-120.
40. Adedara IA, Awogbindin IO, Anamelechi JP, Farombi EO. *Garcinia kola* seed ameliorates renal, hepatic, and testicular oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*. 2015;53(5), 695-704.
41. Afifi M, Almaghrabi OA, Kadasa NM. Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on antioxidants and sperm characteristics in streptozotocin-induced diabetic rat testes. *Biomed Res Int*. 2015;2015, 153573.
42. 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(1), 70-82.
43. Tsounapi P, Honda M, Dimitriadis F, Kawamoto B, Hikita K, Muraoka K, vd. Impact of antioxidants on seminal vesicles function and fertilizing potential in diabetic rats. *Asian J Androl*. 2017;19(6), 639-46.
44. Rashid K, Chowdhury S, Ghosh S, Sil PC. Curcumin attenuates oxidative stress induced NFκB mediated inflammation and endoplasmic reticulum dependent apoptosis of splenocytes in diabetes. *Biochem Pharmacol*. 2017; 143, 140-55.

45. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Chafer-Rudilla M, De Onzono LÍ, Blazquez-Cabrera JA, Miralles-Garcia JM. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity study in rats. *J Androl.* 2010;31(6), 584-92.
46. Basmatzou T, Hatziveis K. Diabetes mellitus and influences on human fertility. *Int J Caring Sci.* 2016;9(1):371-9.
47. Shi GJ, Li ZM, Zheng J, et al. Diabetes associated with male reproductive system damages: Onset of presentation, pathophysiological mechanisms and drug intervention. *Biomed Pharmacother.* 2017;90, 562-74.
48. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999; 48 (1), 1-9.
49. Feyli SA, Ghanbari A, Keshtmand Z. Therapeutic effect of pentoxifylline on reproductive parameters in diabetic male mice. *Andrologia.* 2017;49(1), e12604.
50. Roy VK, Chenkual L, Gurusubramanian G. Protection of testis through antioxidant action of *Mallotus roxburghianus* in alloxan-induced diabetic rat model. *J Ethnopharmacol.* 2015;176, 268-80.
51. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and Chemical Toxicology.* 2012;50(3-4), 719-25.
52. Kwak JM, Mori IC, Pei Z, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, et al. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* 2003;22(11), 2623-33.
53. Sabeur K, Ball BA. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction.* 2007;134(2), 263-70.
54. Zhang L, Pang S, Deng B, Qian L, Chen J, Zou J, et al. High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- κ B/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(4), 629-38.
55. Wang Y, Zhang Z, Guo W, Sun W, Miao X, Wu H, vd. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2014;307(1), 14-23.

56. Kumar TR, Doreswamy K, Shrilatha B. Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002;513(1-2), 103-11.
57. Kannan A, Ramatchandirin B, Sadasivam M, Balakrishnan S. Prahalathan in role of oxidative stress on testicular aquaporins expression in hyperglycemic rats. *Içinde: World Congress of Diabetes India*. 2015:1-5.
58. Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Human Reproduction*. 2002;17(10), 2673-7.
59. Murray FT, Orth J, Gunsalus G, Weisz J, Li JB, Jefferson LS, et al. The pituitary-testicular axis in the streptozotocin diabetic male rat: evidence for gonadotroph, Sertoli cell and Leydig cell dysfunction. *Int J Androl*. 1981;4(1-6), 265-80.
60. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil*. 2010;13(4), 217-25.
61. Ayuob NN, Murad HAS, Ali SS. Impaired expression of sex hormone receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015: 53(1), 35-48.
62. Murray FT, Cameron DF, Vogel RB, Thomas RG, Wyss HU, Zauner CW. The pituitary-testicular axis at rest and during moderate exercise in males with diabetes mellitus and normal sexual function. *J Androl*. 1988;9(3),197-206.
63. George JT, Veldhuis JD, Tena-Sempere M, Millar RP, Anderson RA. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(1), 100-4.
64. Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1997;214(1), 1-10.

65. Ayuob NN, Murad HA, Ali SS. Impaired expression of sex hormone receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs. *Folia Histochem Cytobiol.* 2015;53(1), 35-48.
66. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(3), 147-57.
67. Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(9), 1578-85.
68. Heeba GH, Hamza AA. Rosuvastatin ameliorates diabetes-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress, inflammatory and apoptotic pathways in male rats. *Life Sci.* 2015;141, 13-9.
69. La Vignera S, Condorelli RA, Di Mauro M, et al. Reproductive function in male patients with type 1 diabetes mellitus. *Andrology.* 2015;3(6), 1082-87.
70. Zhao P, Zhou R, Li HN, Yao WX, Qiao HQ, Wang SJ, et al. Oxymatrine attenuated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via improving antioxidant enzyme activities and inhibiting cell death. *Neurochem Int.* 2015;89, 17-27.
71. Zhao P, Zhou RU, Zhu XY, Hao YJ, Li N, Wang J, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice. *Int J Mol Med.* 2015;36(3), 633-44.
72. Mogaddami Z, Sheikhzadeh F, Hatami H, et al. Effects of short- and long-term regular exercise on reproductive tissue in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. *Endocr Regul.* 2018;52(4), 167-75.
73. Quan W, Jung HS, Lee MS. Role of autophagy in the progression from obesity to diabetes and in the control of energy balance. *Arch Pharm Res.* 2013;36, 223-9.
74. Sato S, Kataoka S, Kimura A, Mukai Y. Azuki bean (*Vigna angularis*) extract reduces oxidative stress and stimulates autophagy in the kidneys of streptozotocin-induced early diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016;94(12), 1298-303.
75. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(9), 709-30.

76. Kumar TR, Doreswamy K, Shrilatha B. Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002;513(1-2), 103-11.
77. Baeri M, Abdollahi M. Streptozotocin. In: Wexler P (ed). *Encyclopedia of Toxicology* 4th ed. Oxford: Academic Press, 2024:741-5.
78. Tjälve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*. 1976;69(3), 455-6.
79. Karunanayake EH, Baker JRJ, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14 C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia*. 1976;12(2), 123-8.
80. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000;43(12), 1528-33.
81. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;22(4), 485-518.
82. Weiss RB. Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep*. 1982;66(3), 427-38.
83. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2), 216-26.
84. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(4), 171-81.
85. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294(5838), 284-6.
86. Konrad RJ, Kudlow JE. The role of O-linked protein glycosylation in β -cell dysfunction. *Int J Mol Med*. 2002;10(5), 535-9.
87. Schein PS, Loftus S. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res*. 1968;28(8), 1501-6.
88. Sandler S, Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia*. 1983;25(5), 444-47.

89. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 1981;41(7), 2786-90.
90. Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP. Mechanisms of nitrosourea-induced β -cell damage: activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes.* 1988;37(2),213-6.
91. Schein PS, Cooney DA, Vernon ML. The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.* 1967;27(12), 2324-32.
92. Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, et al. Mice lacking the poly (ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med.* 1999;5(3), 314-9.
93. Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(6), 3059-64.
94. Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(5), 2301-4.
95. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(4), 171-81.
96. Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MHL, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates: lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(12), 2015-20.
97. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 1981;41(7), 2786-90.
98. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197(3), 1458-64.

99. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn.* 1990;13(4), 259-62.
100. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Cellular and molecular Life Sciences.* 1996;52(4), 344-7.
101. Strandell E, Eizirik DL, Korsgren O, Sandler S. Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. *Mol Cell Endocrinol.* 1988;59(1-2), 83-91.
102. Lenzen S, Tiedge M, Panten U. Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Eur J Endocrinol.* 1987;115(1), 21-9.
103. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes.* 1998;47(1), 50-6.
104. Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan-and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *Journal of Biological Chemistry.* 1982;257(11), 6084-8.
105. Rasschaert J, Eizirik DL, Malaisse WJ. Long term in vitro effects of streptozotocin, interleukin-1, and high glucose concentration on the activity of mitochondrial dehydrogenases and the secretion of insulin in pancreatic islets. *Endocrinology.* 1992;130(6), 3522-8.
106. Eizirik DL, Sandler S, Ahnström G, Welsh M. Exposure of pancreatic islets to different alkylating agents decreases mitochondrial DNA content but only streptozotocin induces long-lasting functional impairment of B-cells. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(12), 2275-82.
107. Eizirik DL, Sandler S, Sener A, Malaisse WJ. Defective catabolism of D-glucose and L-glutamine in mouse pancreatic islets maintained in culture after streptozotocin exposure. *Endocrinology.* 1988;123(2), 1001-7.
108. Strandell E, Eizirik DL, Sandler S. Survival and B-cell function of mouse pancreatic islets maintained in culture after concomitant exposure to

- streptozotocin and nicotinamide. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 1989;93(02/03), 219-24.
109. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018;9(9), 345-81.
 110. Aminzadeh E, Haghpanah T, Ganjalikhan Hakemi S, Doostan F, Nematollahi-Mahani SN. Omega-3 with and without insulin replacement alleviates detrimental effects of type II diabetes on reproductive system of male C57BL/6 mice. *Gen Comp Endocrinol*. 2023;344, 114370.
 111. Wang S, Chen Q, Zhang Y, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids alleviate hydrogen sulfide-induced blood-testis barrier disruption in the testes of adult mice. *Reprod Toxicol*. 2020;98, 233-41.
 112. Layton C, Bancroft JD, Suvarna SK. In: 4- Fixation of tissues. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* 8th ed. Elsevier, 2019:40-63.
 113. Hess RA, Linder RE, Strader LF, Perreault SD. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat. II. Quantitative and qualitative histopathology of the testis. *J Androl*. 1988;9(5), 327-42.
 114. Aslan M, Gül M, Üremiş N, Akbulut S, Gürünlüoğlu S, Özsoy EN, et al. Ninety sixth-hour impact of scalding burns on end organ damage, systemic oxidative stress, and wound healing in rats treated with three different types of dressings. *Journal of Burn Care & Research*. 2024;45(3), 733-43.
 115. Choi NH, Tobe T, Hara K, Yoshida H, Tomita M. Sandwich ELISA assay for quantitative measurement of SP-40, 40 in seminal plasma and serum. *J Immunol Methods*. 1990;131(2), 159-63.
 116. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2), 351-8.
 117. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1), 70-7.
 118. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34(3), 497-500.
 119. Hadwan MH, Khabt H. Simple Spectrophotometric Method for Analysis of Serum Catalase Activity. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 2018;12(9).

120. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem.* 1951:193(1), 265-75.
121. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004:37(4), 277-85.
122. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005:38(12), 1103-11.
123. Temidayo SO, du Plessis SS. Diabetes mellitus and male infertility. *Asian Pacific Journal of Reproduction.* 2018:7(1), 6-14.
124. Kayhan E. Prepubertal Dönemden Erişkin Döneme Kadar Uygulanan Farklı Beslenme Tiplerinin Testis, Spermatogenez ve Sperm Kalitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması [Doktora tezi]. Malatya: İnönü Üniversitesi; 2024.
125. Djuricic I, Calder PC. Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients.* 2021:13(7), 2421.
126. Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. *Lipid biochemistry.* Springer; 2002:13.
127. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014:18(1), 1.
128. Peschke E. *Endokrinologie: Vorträge im Rahmen des Projekts 'Zeitstrukturen endokriner Systeme'.* C. 60. Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig; 2007.
129. Edo GI, Jikah AN, Onoharigho FO, Akpogheli PO, Agbo JJ, Ekokotu HA, et al. The ameliorative effects of *Vernonia amygdalina* extract on superoxide dismutase and glutathione s-transferase on alloxan induced diabetes on male Wistar rats. *Food Chemistry Advances.* 2024:(4), 100620.
130. Deng D, Sun P, Yan C, Ke M, Jiang X, Xiong L, vd. Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature.* 2015:526(7573), 391-6.
131. Kandror K V, Pilch PF. Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 1996:271(1), 1-14.
132. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001:50(6), 537-46.

133. Islin H, Capito K, Hansen SE, Hedekov CJ, Thams P. Ability of omega-3 fatty acids to restore the impaired glucose tolerance in a mouse model for type-2 diabetes. Different effects in male and female mice. *Acta Physiol Scand*. 1991;143(2), 153-60.
134. Wang H, Wang Z, Gao Y, Wang J, Yuan Y, Zhang C, et al. STZ-induced diabetes exacerbates neurons ferroptosis after ischemic stroke by upregulating LCN2 in neutrophils. *Exp Neurol*. 2024;377, 114797.
135. Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG. The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2011;28(5), 887-98.
136. Andallu B, Varadacharyulu NCh. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clinica Chimica Acta*. 2003;338(1), 3-10.
137. Hasan MM, El-Shal AS, Mackawy AMH, Ibrahim EM, Abdelghany EMMA, Saeed AA, et al. Ameliorative effect of combined low dose of Pioglitazone and omega-3 on spermatogenesis and steroidogenesis in diabetic rats. *J Cell Biochem*. 2020;121(2), 1524-40.
138. Arai T, Kim H ju, Chiba H, Matsumoto A. Anti-obesity effect of fish oil and fish oil-fenofibrate combination in female KK mice. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(5), 674-83.
139. Al-Roujeaie AS, Abuohashish HM, Ahmed MM, Alkhamees OA. Effect of rutin on diabetic-induced erectile dysfunction: Possible involvement of testicular biomarkers in male rats. *Andrologia*. 2017;49(8), 12737.
140. Zha W, Bai Y, Xu L, Liu Y, Yang Z, Gao H, vd. Curcumin Attenuates Testicular Injury in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Biomed Res*. 2018;(1), 7468019.
141. Ma B, Zhang J, Zhu Z, Bao X, Zhang M, Ren C, et al. Aucubin, a natural iridoid glucoside, attenuates oxidative stress-induced testis injury by inhibiting JNK and CHOP activation via Nrf2 up-regulation. *Phytomedicine*. 2019;64, 153057.
142. Ramalho-Santos J, Amaral S, Oliveira PJ. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4(1), 46-54.

143. Altamimi JZ, AlFaris NA, Aljabryn DH, Alagal RI, Alshammari GM, Aldera H, et al. Ellagic acid improved diabetes mellitus-induced testicular damage and sperm abnormalities by activation of Nrf2. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(8), 4300-10.
144. Rehman K, Beshay E. Diabetes and male sexual function. *Journal of Sexual & Reproductive Medicine.* 2001;1(1).
145. Mazza M, Pomponi M, Janiri L, Bria P, Mazza S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31(1), 12-26.
146. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology.* 2004;2, 1-7.
147. Bayram S, Kizilay G, Topcu-Tarlacalisir Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis. *Biotechnic & Histochemistry.* 2016;91(3), 204-11.
148. Nazemi S, Shahabi P. Effect of testosterone on intracellular signaling pathway of angiogenesis in sciatic nerve of male diabetic rats. *Biomedical & Pharmacology Journal.* 2015;8(2), 823-9.
149. Zanjani SB, Chodari L, Babil FM, Sadeghzadeh P, Shahabi P. Effect of voluntary exercise on intracellular signalling pathways of angiogenesis in the sciatic nerve of type 1 diabetic castrated male rats. *Physiol Int.* 2019;106(1), 39-47.
150. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, et al. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers.* 2014;2014(1), 108106.
151. Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee HK, Lee JH, Chu YK, vd. Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(2), 1190-7.
152. Long L, Qiu H, Cai B, Chen N, Lu X, Zheng S, vd. Hyperglycemia induced testicular damage in type 2 diabetes mellitus rats exhibiting microcirculation impairments associated with vascular endothelial growth factor decreased via PI3K/Akt pathway. *Oncotarget.* 2018;9(4), 5321.

153. Sargent KM, McFee RM, Gomes RS, Cupp AS. VEGFA: Just one of multiple mechanisms for Sex-Specific Vascular Development within the testis? *J Endocrinol.* 2015;227(2), 31.
154. Robinson R, Fritz IB. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod.* 1981;24(5), 1032-41.
155. Setchell BP, Voglmayr JK, Waites GMH. A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph. *J Physiol.* 1969;200(1), 73-85.
156. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 2013;1832(5), 626-35.
157. Erol B, Tefekli A, Ozbey I, Salman F, Dincag N, Kadioglu A, vd. Sexual dysfunction in type II diabetic females: a comparative study. *J Sex Marital Ther.* 2002;28(1), 55-62.
158. Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, et al. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5), 2636-41.
159. Cameron DF, Rountree J, Schultz RE, Repetta D, Murray FT. Sustained hyperglycemia results in testicular dysfunction and reduced fertility potential in BBWOR diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism.* 1990;259(6), 881-9.
160. Ahangarpour A, Oroojan AA, Heidari H, Ghaedi E, Taherkhani R. Effects of hydro-alcoholic extract from *Arctium lappa* L. (Burdock) root on gonadotropins, testosterone, and sperm count and viability in male mice with nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetes. *Malays J Med Sci.* 2015;22(2), 25.
161. De Young L, Yu D, Bateman RM, Brock GB. Oxidative stress and antioxidant therapy: Their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *J Androl.* 2004;25(5), 830-6.
162. Gobbo MG, Costa CFP, Silva DGH, de Almeida EA, Góes RM. Effect of melatonin intake on oxidative stress biomarkers in male reproductive

organs of rats under experimental diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2015:2015(1), 614579.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Kararı

