



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POSTNATAL GELİŞİM SÜRECİNDE SIÇAN TESTİS VE
EPİDİDİMİNDE GSTK1 VE GSTT1 İFADESİNİN
İNCELENMESİ**

Mustafa ÖZTOP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK

BURDUR-2025

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POSTNATAL GELİŞİM SÜRECİNDE SIÇAN TESTİS VE
EPİDİDİMİNDE GSTK1 VE GSTT1 İFADESİNİN
İNCELENMESİ**

Mustafa ÖZTOP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 1012-YL-24 Proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Mustafa Öztıp tarafından *Doç. Dr. Mehmet Özbek* yönetiminde hazırlanan “*Postnatal Gelişim Sürecinde Sıçan Testis ve Epididimisinde GSTK1 ve GSTT1 İfadesinin İncelenmesi*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği Veterinerlik Histoloji ve Embriyoloji Dalında ***Yüksek Lisans Tezi*** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 14/08/2025

Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
Başkan

Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK
Burdur Mehmet Akif Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Seda YAKUT
Burdur Mehmet Akif Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi sırasında, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, beni yüreklendiren, güler yüzünü, samimiyetini benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Harun KARACA, Arş. Gör. Rüveyda Hilal AKI ve doktora öğrencisi Meryem ŞİMŞEK'e destekleri için teşekkür ederim. Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.



ETİK BEYAN

“Postnatal Gelişim Sürecinde Sıçan Testis ve Epididimisinde GSTK1 ve GSTT1 İfadesinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Mustafa ÖZTOP

14/08/2025

İmza:

(Faint, stylized signature watermark)

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR SAYFASI	iii
ETİK BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER SAYFASI	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Neonatal Dönem (0-7 Gün)	5
2.2. Erken İnfantil Dönem (8-14 Gün)	6
2.3. Geç İnfantil Dönem (15-20 Gün)	8
2.4. Juvenil Dönem (21-32 Gün)	11
2.5. Peri-Pubertal Dönem (33-55 Gün)	13
2.6. Geç Ergenlik Dönemi (Postnatal 56. Gün sonrası)	15
2.7. Reaktif Oksijen Türleri	17
2.8. ROS Üretim Kaynakları ve Oluşum Mekanizmaları	18
2.9. ROS Sınıflandırılması ve Yapısal Özellikleri	19
2.10. ROS'un Reaktivite Mekanizmaları ve Biyolojik Etkileri	20
2.11. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimleri ve Özellikleri	22
2.11.1. GST Ailesine Genel Bakış	22
2.11.2. GSTK1: Yapısal ve İşlevsel Özellikler	25
2.11.3. GSTT1: Yapısal ve İşlevsel Özellikler	26
2.12. GST Enzimlerinin Antioksidan Savunmadaki Görevleri	28
2.13. Erkek Üreme Sisteminde ROS Oluşumu ve GSTK1/GSTT1'in Roller	30
2.13.1. Testis ve Spermatogenezde Oksidatif Denge	30
2.13.2. Epididimis ve Sperm Matürasyonunun Mikroçevresi	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Deney Düzenneği ve Etik Kurul İzni	37
3.2. İmmunohistokimyasal Analiz	37
3.3. İmmunohistokimyasal Boyamaların Semikantitatif analiz	38
3.4. Kantitatif İmmunohistokimyasal Görüntü Analizi	39
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	39
4. BULGULAR	41
4.1. Pozitif ve Negatif Kontrol Değerlendirmesi	41
4.2. Postnatal 5. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi	43
4.3. Postnatal 20. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi	45
4.4. Postnatal 50. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi	47
4.5. Postnatal 70. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi	51
4.6. GSTK1 Kantitatif Analizi	55
4.7. Postnatal 5. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi	57

4.8. Postnatal 20. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi	60
4.9. Postnatal 50. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi	62
4.10. Postnatal 70. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi	67
4.11. GSTT1 Kantitatif Analizi	72
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	89



ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Reaktif oksijen türleri oluşumunun kimyasal temeli	19
Şekil 2.2.	Erkek üreme sisteminde ROS'un fizyolojik ve patolojik rolleri	31
Şekil 4.1.	GSTK1 pozitif kontrol	41
Şekil 4.2.	GSTT1 pozitif kontrol	42
Şekil 4.3.	Negatif kontrol	42
Şekil 4.4.	PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	43
Şekil 4.5.	PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	44
Şekil 4.6.	PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTK1 ifadesi	44
Şekil 4.7.	PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTK1 ifadesi	45
Şekil 4.8.	PND20 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	46
Şekil 4.9.	PND20 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTK1 ifadesi	46
Şekil 4.10.	PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	48
Şekil 4.11.	PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	48
Şekil 4.12.	PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (başlangıç segmenti) GSTK1 ifadesi	49
Şekil 4.13.	PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (kaput segmenti) GSTK1 ifadesi	49
Şekil 4.14.	PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (korpus segmenti) GSTK1 ifadesi	50
Şekil 4.15.	PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (kauda segmenti) GSTK1 ifadesi	50
Şekil 4.16.	PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	52
Şekil 4.17.	PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi	52
Şekil 4.18.	PND70 dönemi sıçan epididimisinin başlangıç segmentinde GSTK1 ifadesi	53
Şekil 4.19.	PND70 dönemi sıçan epididimisinin kaput segmentinde GSTK1 ifadesi	53
Şekil 4.20.	PND70 dönemi sıçan epididimisinin korpus segmentinde GSTK1 ifadesi	54
Şekil 4.21.	PND70 dönemi sıçan epididimisinin kauda segmentinde GSTK1 ifadesi	54
Şekil 4.22.	GSTK1 immünreaktivitesine ilişkin kantitatif analiz sonuçları	57
Şekil 4.23.	PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	58
Şekil 4.24.	PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	58
Şekil 4.25.	PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi	59
Şekil 4.26.	PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi	59
Şekil 4.27.	PND20 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	60
Şekil 4.28.	PND20 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	61
Şekil 4.29.	PND20 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi	61
Şekil 4.30.	PND20 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi	62
Şekil 4.31.	PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	63
Şekil 4.32.	PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	64
Şekil 4.33.	PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	64
Şekil 4.34.	PND50 dönemi sıçan epididimisinin başlangıç segmentinde	65

	GSTT1 ifadesi	
Şekil 4.35.	PND50 dönemi sıçan epididimisinin kaput segmentinde GSTT1 ifadesi	65
Şekil 4.36.	PND50 dönemi sıçan epididimisinin korpus segmentinde GSTT1 ifadesi	66
Şekil 4.37.	PND50 dönemi sıçan epididimisinin kauda segmentinde GSTT1 ifadesi	66
Şekil 4.38.	PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	68
Şekil 4.39.	PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	68
Şekil 4.40.	PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi	69
Şekil 4.41.	PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun başlangıç segmentinde GSTT1 ifadesi	69
Şekil 4.42.	PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun kaput segmentinde GSTT1 ifadesi	70
Şekil 4.43.	PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun korpus segmentinde GSTT1 ifadesi	70
Şekil 4.44.	PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun kauda segmentinde GSTT1 ifadesi	71
Şekil 4.45.	GSTT1 immünreaktivitesine ilişkin kantitatif analiz sonuçları	73

TABLÖLAR

Tablo 4.1. Postnatal gelişim aşamalarındaki sıçanlarda GSTK1 immün reaksiyonunun subjektif değerlendirmesi	55
Tablo 4.2. Postnatal gelişim aşamalarındaki sıçanlarda GSTT1 immün reaksiyonunun subjektif değerlendirmesi	72



SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP	Androjen bağlayıcı protein
DHT	Dihidrotestosteron
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz
GSTK1	Glutasyon S-Transferaz Kappa 1
GSTT1	Glutasyon S-Transferaz Theta 1
LH	Luteinleştirici Hormon
PRL	Prolaktin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz



ÖZET

Postnatal Gelişim Sürecinde Sıçan Testis ve Epididimisinde GSTK1 ve GSTT1 İfadesinin İncelenmesi

Testis ve epididimis, postnatal gelişimde karmaşık hücrel farklılaşma ve hormonal düzenlemelerle işlevsel hale gelir. Bu süreçlerde artan reaktif oksijen türleri, oksidatif stres potansiyeli yaratır. Glutasyon S-transferaz (GST) enzimleri, indirgenmiş glutasyonu zararlı bileşiklerle birleştirerek bu strese karşı koruma sağlayan antioksidan savunma sisteminin önemli bir parçasıdır. GSTK1 ve GSTT1 izoenzimlerinin ifadesindeki değişikliklerin sperm kalitesi, DNA bütünlüğü ve hormon dengesini etkileyerek erkek infertilitesiyle ilişkili olabilir. Bu çalışmada GSTK1 ve GSTT1 izoenzimlerinin sıçan testis ve epididimis (başlangıç, kaput, korpus ve kauda) dokularındaki postnatal gelişim süresince (neonatal: 5. gün, infantil: 20. gün, peripubertal: 50. gün, geç ergenlik: 70. gün) hücrel lokalizasyon ve ifade biçimleri değerlendirilmiştir. İfade düzeyleri immünohistokimyasal yöntem ile belirlenmiştir. Semikantitatif skorlamaya ek olarak kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. GSTK1 açısından neonatal dönemde testis dokusunda yalnızca gonositlerde sınırlı düzeyde immünreaktivite gözlenmiş, Sertoli ve Leydig hücreleri negatif bulunmuştur. Infantil dönemde spermatositler ve Leydig hücrelerinde pozitiflik saptanmıştır. Peripubertal dönemde primer spermatositlerde en yüksek düzeyler görülmüş, diğer germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinde ifade daha düşük seviyelerde seyretmiştir. Geç ergenlik döneminde primer spermatositlerdeki yoğunluk korunmuş, diğer hücre tiplerinde sınırlı düzeyler devam etmiştir. Epididimis epitelinde artış yaşla birlikte belirginleşmiş, maksimum değer geç ergenlik döneminde kauda segmentinde tespit edilmiştir. Kantitatif analizde testis için en yüksek değer geç ergenlik döneminde elde edilmiştir. GSTT1 açısından neonatal dönemde testiste yalnızca Leydig hücrelerinde güçlü pozitiflik bulunmuş, germ hücreleri ve Sertoli hücreleri negatif olarak değerlendirilmiştir. Infantil dönemde Leydig hücrelerindeki yüksek ifade korunmuş, spermatogonyum, spermatosit ve Sertoli hücrelerinde düşük düzeyli pozitiflik ortaya çıkmıştır. Peripubertal ve geç ergenlik dönemlerinde Leydig hücrelerindeki ifade devam etmiş, germ hücrelerinde düşük seviyeler izlenmiştir. Epididimis epitelinde neonatal dönemde düşük olan GSTT1 ifadesi, infantil dönemden itibaren artmış ve en yüksek düzeyler peripubertal ve geç ergenlik dönemlerinde kauda segmentinde tespit edilmiştir. Kantitatif analizde testis için en yüksek değer peripubertal ve geç ergenlik döneminde gözlenmiştir. Sonuç olarak, GSTK1 daha çok germ hücrelerinde, özellikle primer spermatositlerde ve epididimis distal segmentinde yoğunlaşırken; GSTT1 esas olarak Leydig hücrelerinde ve epididimis epitelinde yaygın olarak ifade edilmiştir. Bulgular, antioksidatif savunma mekanizmalarının postnatal gelişim süresince hücre tipi ve bölgeye özgü olarak farklılaştığını ve her iki enzimin oksidatif stresin kontrolünde tamamlayıcı roller üstlendiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epididimis, Glutasyon-S-transferazlar, Oksidatif Stres, Testis

ABSTRACT

Investigation of GSTK1 and GSTT1 expression in rat testis and epididymis during postnatal development

The testis and epididymis are crucial components of the male reproductive system, becoming functional during the postnatal development process through complex cellular differentiation and hormonal regulations. Throughout these processes, the production of reactive oxygen species increases, elevating the potential for oxidative stress. Glutathione S-transferases (GSTs) are an important part of the antioxidant defense system that counteracts this condition by conjugating reduced glutathione with harmful compounds, thereby neutralizing them. Changes in the expression of GSTK1 and GSTT1 isoenzymes may be associated with male infertility by affecting sperm quality, DNA integrity, and hormonal balance. In this study, the cellular localization and expression patterns of GSTK1 and GSTT1 isoenzymes were evaluated in the testis and epididymis (initial segment, caput, corpus, and cauda) tissues of rats during postnatal development (neonatal: 5th day, infantile: 20th day, peripubertal: 50th day, late pubertal: 70th day). Expression levels were determined using the immunohistochemical method. Besides semiquantitative scoring, a quantitative analysis was performed. Limited GSTK1 immunoreactivity was observed only in gonocytes in the testis tissue during the neonatal period, while Sertoli and Leydig cells were found to be negative. During the infantile period, positivity was detected in spermatocytes and Leydig cells. The highest levels were seen in primary spermatocytes during the peripubertal period, with expression remaining at lower levels in other germ cells and Sertoli cells. In the late pubertal period, the intensity in primary spermatocytes was maintained, while limited levels continued in other cell types. In the epididymal epithelium, the increase became more pronounced with age, with the maximum value detected in the cauda segment during the late pubertal period. In the quantitative analysis for the testis, the highest value was obtained during the late pubertal period. Strong GSTT1 positivity was found only in Leydig cells in the testis during the neonatal period, while germ cells and Sertoli cells were evaluated as negative. During the infantile period, the high expression in Leydig cells was maintained, and low-level positivity emerged in spermatogonium, spermatocytes, and Sertoli cells. Expression in Leydig cells continued during the peripubertal and late pubertal periods, with low levels observed in germ cells. In the epididymal epithelium, GSTT1 expression, which was low in the neonatal period, increased from the infantile period onwards, and the highest levels were detected in the cauda segment during the peripubertal and late pubertal periods. In the quantitative analysis for the testis, the highest value was observed during the peripubertal and late pubertal periods. In conclusion, GSTK1 is more concentrated in germ cells, particularly primary spermatocytes, and the distal segment of the epididymis, while GSTT1 is predominantly expressed in Leydig cells and the epididymal epithelium. The findings indicate that antioxidant defense mechanisms differentiate in a cell-type and region-specific manner during postnatal development and that both enzymes undertake complementary roles in the control of oxidative stress.

Keywords: Epididymis, Glutathione S-transferases, Oxidative Stress, Testis

1. GİRİŞ

Erkek üreme sisteminin işlevsel bütünlüğü, temel olarak iki önemli organın uyum içerisinde çalışmasına dayanmaktadır: Testis ve epididimis. Testis, erkek gamet hücrelerinin, yani spermatozoaların üretildiği spermatogenez sürecinin gerçekleştiği esas üreme organıdır. Bu karmaşık süreç, seminifer tübüller adı verilen özelleşmiş yapılar içerisinde, kök hücre niteliğindeki spermatogonyumların bir dizi mitotik ve mayotik bölünme geçirerek olgun spermatozoalara farklılaşmasıyla tamamlanır. Bu gelişim, germ hücrelerini besleyen, koruyan ve destekleyen Sertoli hücreleri ile tübüller arasındaki interstisyel alanda yer alan ve testosteron sentezinden sorumlu Leydig hücreleri tarafından oluşturulan mikroçevre içinde hassas bir şekilde yönetilir. Testisten ayrılan spermatozoalar morfolojik olarak olgunlaşmış olsalar da henüz hareket ve dölleme yeteneğinden yoksundurlar. Bu yeteneklerini, testislerle ilişkili bir organ olan epididimiste kazanırlar. Epididimis başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kuyruk olmak üzere anatomik ve işlevsel olarak farklı bölümlere ayrılan uzun, kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Spermatozoalar, bu yapı boyunca ilerlerken, epididimal epitel tarafından salgılanan çeşitli proteinler ve moleküllerle etkileşime girerek biyokimyasal ve yapısal olgunlaşma sürecinden geçerler ve fertilizasyon kapasitesine ulaşarak kauda segmentinde depolanırlar (Picut ve ark., 2015).

Bu organların işlevsel kapasitelerine ulaşması, postnatal periyot boyunca gerçekleşen ve neonatal, infantil, juvenil, peri-pubertal ve post-pubertal olarak sınıflandırılan ardışık gelişim evrelerini kapsayan kapsamlı bir yeniden yapılanma sürecini gerektirir. Bu evreler boyunca, seminifer tübüllerin lümensiz kord yapısından lümenli tübül formuna geçişi, çaplarının artması, kan-testis bariyerinin kurulması ve germ hücre serilerinin kompozisyonundaki değişimler gibi temel histomorfolojik transformasyonlar gözlenir. Bu dinamikler, hipotalamus-hipofiz-gonad eksenin aktivasyonu ile düzenlenen endokrin sinyaller ve parakrin etkileşimler tarafından hassas bir şekilde yönetilir (Shima, 2022).

Bu yoğun metabolik ve proliferatif aktivite, kaçınılmaz olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde bir artışa neden olur. ROS, fizyolojik konsantrasyonlarda hücrelerel sinyal yollarının modülasyonunda rol alarak gelişimi desteklerken,

antioksidan savunma mekanizmalarını aşan düzeyde birikimi oksidatif stres sorununu ortaya çıkarmaktadır. Erkek üreme sistemi, sperm plazma membranlarının yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içermesi, spermatozoaların sınırlı sitoplazmik antioksidan kapasitesi ve sürekli hücre bölünmesi gibi nedenlerle oksidatif hasara karşı oldukça savunmasızdır. ROS üretimindeki kontrolsüz artış lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi sitotoksik hasarlara yol açarak germ hücre apoptozunu tetikleyebilir, sperm morfolojisini bozabilir ve sonuç olarak fertilite kapasitesine ciddi şekilde azaltabilir (Barati ve ark., 2020).

Hücreler, bu oksidatif tehdide karşı, Faz II detoksifikasyon sisteminin üyeleri olan glutatyon S-transferazlar (GST'ler) da dahil birçok enzim ve molekülden oluşan karmaşık ve etkin antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. GST enzimleri, hücrenin temel antioksidan molekülü olan indirgenmiş glutatyonu (GSH), çeşitli endojen ve eksojen toksik elektrofilik bileşiklere konjüge ederek bu maddelerin biyolojik olarak inaktif ve vücuttan uzaklaştırılabilir maddelere dönüştürülmesini katalize ederler. Bu enzim ailesi içinde, mitokondriyal matrikste lokalize olan GSTK1 ve sitozolik bir enzim olan GSTT1, hücre altı yerleşimlerine özgü işlevleriyle dikkat çekmektedirler. GSTK1, özellikle enerji metabolizmasının yoğun olduğu mitokondrilerde oluşan oksidatif yan ürünlerin detoksifikasyonunda etkin bir rol oynarken; GSTT1, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif karbonil bileşiklerinin ve çeşitli ksenobiyotiklerin nötralizasyonunda görev alır (Ferreira ve ark., 2023; Raza, 2011; Salinas ve Wong, 1999; Sharma ve ark., 2004).

GST izoenzimlerinin ifade profillerinin üreme dokularında gelişimsel olarak düzenlendiğini ve bu düzenlemenin spermatogenezin verimliliği ile sperm kalitesinin sürdürülmesinde hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, bu enzimlerin postnatal dönemdeki konumsal-zamansal dağılımının ve yoğunluğunun ortaya çıkarılması, erkek fertilitésinin altında yatan fizyolojik mekanizmaların ve oksidatif stres kaynaklı infertilitedeki patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması bakımından son derece önemlidir. Literatür taraması sonucunda farklı postnatal gelişimsel dönemlerindeki sıçan testis ve epididimis dokusunda GSTK1 ve GSTT1 proteinlerin ifade düzeyine yönelik herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu tez

çalışmasında erkek Wistar albino sıçan (*Rattus norvegicus*) testis ve epididimis (başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda) dokularında GSTK1 ve GSTT1 proteinlerinin ifade düzeyleri immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır (Fafula ve ark., 2019; Kys ve ark., 1992; Shu ve ark., 2023; Zeng ve ark., 2022).

Çalışma, postnatal gelişimin kritik evrelerini temsil eden dört farklı yaş grubunda (her grupta n = 6) gerçekleştirilmiştir: postnatal 5. gün (PND5, neonatal dönem), postnatal 20. gün (PND20, infantil dönem), postnatal 50. gün (PND50, peripubertal dönem) ve postnatal 70. gün (PND70, geç ergenlik dönemi). Her yaş grubundaki hayvanlardan alınan doku örnekleri Bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra standart histolojik takip aşamalarından geçirilmiştir. Alkol serileri, metil benzoat ve benzen uygulamalarını takiben parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan alınan kesitler immünohistokimyasal boyamaya tabi tutularak, GSTK1 ile GSTT1 proteinlerinin hücresel lokalizasyonu, dağılım yoğunluğu ve dönemsel farklılıkları değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal bulgulara göre, PND5'te testis dokusunda GSTK1 ifadesi zayıf düzeyde olup, başlıca Sertoli hücrelerinde sınırlı sitoplazmik reaksiyon şeklinde saptanmıştır. Bu dönemde GSTT1 proteini belirgin bir immünreaktivite göstermemiştir. PND20'de GSTK1 ifadesi Sertoli hücrelerinde belirgin artış göstermiş ve bazı spermatogonyumlarda pozitif boyanma izlenmiştir. Aynı dönemde GSTT1 proteini, interstisyel bölgede özellikle gelişmekte olan Leydig hücrelerinde yoğun olarak lokalize olmuştur. PND50'de GSTK1 ifadesi spermatositler ve erken spermatidler başta olmak üzere seminifer tübül germ hücrelerinde artış göstermiştir. GSTT1 ise hem germ hücreleri hem de interstisyel hücrelerde yaygın olarak ifade edilmiştir. PND70'te GSTK1 proteini, özellikle olgunlaşmakta olan spermatidlerin sitoplazmasında yoğun olarak lokalize olmuş; epididimisin kauda bölgesinde de güçlü immünreaktivite sergilemiştir. Aynı dönemde GSTT1 proteini, kaput ve kauda epididimis bölgelerinde yüksek yoğunlukta ifade edilmiş; testiste ise ileri evredeki spermatidler ve interstisyel hücrelerde belirginleşmiştir. Elde edilen veriler, GSTK1 ve GSTT1 enzimlerinin testis ve epididimis gelişiminde hem dönemsel hem de hücre tipine özgü bir ifade paterni sergilediğini ortaya koymaktadır. Bulgular, bu enzimlerin postnatal gelişim süresince oksidatif dengenin korunmasında,

germ hücre maturasyonunun desteklenmesinde ve epididimal işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol üstlendiğini göstermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Neonatal Dönem (0–7 Gün)

Neonatal dönem (postnatal gün 0–7), testisin doğum sonrası çevresel ve hormonal değişimlere adaptasyon sağladığı ilk evredir. Bu süreçte testis henüz olgunlaşmamıştır ve seminifer tübüller, lümensiz yapılar olan seminifer kordlar şeklindedir. Bu kordlar, oldukça dar çaplıdır ve içleri yüksek hücresel yoğunlukta, sık dizilmiş germ ve somatik hücrelerle doludur. Seminifer kordların merkezinde gonositler yer alır ve bu hücreler, çevrelerinde yoğun şekilde mitoz geçiren immatür Sertoli hücreleri ile birlikte testisin yapısal temelini oluşturur. Kan-testis bariyeri ile lümen oluşumu henüz başlamamıştır. Doğum sonrası ilk günlerde gonositler, kordların merkezinden bazal laminaya doğru göç ederek spermatogonial hücre tipine dönüşmeye başlar. Postnatal 6. ila 7. gün civarında bu dönüşüm tamamlanır ve testis dokusunda artık spermatogonyumlar ve somatik hücreler görülmeye başlar (Malkov ve ark., Picut ve ark., 2015). Bu sırada Sertoli hücreleri immatür karakterdedir ve yüksek proliferatif aktivite gösterir. Yeni doğan sıçan testisinde Sertoli hücre proliferasyonu oldukça belirgindir ve bu artış postnatal ikinci haftanın sonuna kadar devam eder. Sertoli hücrelerinin sayıca artmasıyla birlikte inhibin salgısı da artış gösterir. Bu durum, negatif geribildirim yoluyla hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını baskılamaya başlar. Doğumdan hemen sonraki günlerde FSH düzeyi oldukça yüksektir ve gonositlerin spermatogonyumlara dönüşümünü destekleyen temel hormonal etkidir. Ancak inhibin salgısındaki artış ile birlikte neonatal dönemin sonuna doğru FSH düzeyi düşmeye başlar (Nascimento ve ark., 2016; Picut ve ark., 2015). Neonatal dönemde luteinleştirici hormon (LH) düzeyleri de görece artış gösterir. Fötal dönemde sıçanlarda testis gelişimi, LH'dan bağımsız olarak gerçekleştiği için doğumdan sonra kısa süreli bir hormonal yükseliş meydana gelir. Bu geçici hormonal dalgalanma, literatürde “mini-puberte” olarak tanımlanmakta olup insanlarda doğum sonrası 3–6. aylar arasında, sıçanlarda ise doğumu takip eden ilk 6 saat içinde gözlenmektedir (Picut ve ark., 2018). Bu kısa süreli, geçici hormon artışı, testis ve androjen yanıt veren dokuların erken androjenik uyarıya maruz kalmasını sağlar. Neonatal süreçte serum testosteron düzeyi genellikle düşüktür. Bu dönemde testisteki tek steroid üreten hücre topluluğu, embriyonik kökenli fetal Leydig

hücreleridir. Hipofiz-hipofiz-gonad eksenini, henüz tam olarak aktive olmadığı için fetal Leydig hücreleri, LH'dan bağımsız şekilde androjen üretmeye devam eder (Ye ve ark., 2017). Ancak bu hücrelerin sayısı, doğum sonrası dönemde azalmaya başlar. Gerçekten de postnatal gün 0 ile 14 arasında testis dokusunda fetal Leydig hücrelerinin sayısında belirgin bir azalma meydana gelir. Bu dönemde erişkin tip Leydig hücreleri testiste henüz belirginleşmemiştir. Ancak interstisyel alanda, ilerleyen gelişim evrelerinde farklılaşacak olan yeni Leydig hücre topluluklarına ait progenitor hücreler oluşmaya başlamıştır (Picut ve ark., 2015). Testisin interstisyel bölgesi bu dönemde oldukça geniştir. Seminifer kordlar, küçük ve dar olduğundan parankimal dokunun büyük bölümünü interstisyum oluşturmaktadır. Bu nedenle neonatal dönemde testis hacminin yaklaşık %37'sinin interstisyel doku tarafından kaplandığı bildirilmektedir (Dorostghoal ve ark., 2011).

2.2. Erken İnfantil Dönem (8–14 Gün)

Neonatal evrenin ardından gelen ve testis dokusunda belirgin hücresel çoğalma ile karakterize önemli bir gelişim dönemidir. Bu dönemde seminifer tübüller hâlâ lümensizdir ancak çapı genişlemeye başlamıştır. Kordon yapısı daha belirgin hâle gelmiştir fakat halen tübül lümeni veya sıvı dolu boşluk gözlenmez. Germ hücre topluluğunun büyük bölümünü oluşturan spermatogonyumlar, bu dönemde testis parankiminde baskın hâle gelmiştir ve yoğun mitotik aktivite göstererek hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Seminifer tübül bazalinde dizilen bu hücreler, dönemin ayırt edici özelliği olan yüksek proliferatif görünümü kazandırır. İkinci haftanın sonuna yaklaşıldığında, artan spermatogonyum sayısı Sertoli hücreleriyle birlikte çift katmanlı bir organizasyon oluşturmaya başlar. Bu yapı, “rozet” oluşumu olarak tanımlanır. Histolojik olarak, bir Sertoli hücresinin çevresine çelenk biçiminde yerleşmiş spermatogonyumlardan oluşan bu dizilim, infant testisin karakteristik morfolojik özelliğidir. Dış tabakada tip A ve tip B spermatogonyumlar yer alırken, iç tabakada Sertoli hücrelerinin çekirdekleri yoğun şekilde izlenir (Picut ve ark., 2015). Bu yapı, lümensiz ancak gelişim halindeki seminifer epitelin erken dönemdeki organizasyonunu yansıtır. Dönem boyunca spermatogenez mitotik evre ile sınırlıdır. Ancak postnatal 13. ve 14. günlerde bazı tübüllerde ilk mayotik bölünmelerin başladığı ve leptoten evresinde primer spermatositlerin görülebildiği bildirilmiştir. Buna rağmen

bu süreçte henüz haploid hücre oluşumuna (spermatid gelişimine) rastlanmaz (Malkov ve ark., 1998).

Sertoli hücreleri, bu dönemde hâlâ immatür özellik taşımaktadır ve aktif olarak bölünmeye devam etmektedir. Bu hücrelerin mitotik aktivitesi, seminifer tübüllerdeki hücre yoğunluğunun artmasına doğrudan katkı sağlar. Ancak ikinci haftanın sonlarına doğru Sertoli hücrelerinde mitotik bölünme yavaşlar ve hücresel farklılaşma süreci başlar (Picut ve ark., 2015). Literatürde, sıçanlarda Sertoli hücrelerinin genellikle postnatal 16. ila 18. gün arasında mitotik aktivitesini sonlandırdığı ve son olgunlaşma evresine geçtiği bildirilmektedir. Bu süreçle birlikte, Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı komplekslerinin ilk yapısal öncülleri de gelişmeye başlar (Malkov ve ark., 1998). Özellikle okludin ve klaudin gibi bağlantı proteinlerinin ifadesi yaklaşık olarak postnatal 10. günden itibaren saptanabilir düzeye ulaşır. Ancak işlevsel kan-testis bariyerinin tam olarak kurulması bir sonraki dönemde görülmektedir (Gerber ve ark., 2016).

Leydig hücre topluluğu açısından bu dönem, önemli bir geçiş sürecini temsil etmektedir. Doğum öncesi testiste aktif olan fetal Leydig hücreleri, postnatal süreçte azalmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar, bu hücrelerin doğumdan itibaren 14. güne kadar sayıca azaldığını ve işlevlerini kaybetmeye başladığını göstermektedir. Bununla birlikte, bu dönemde yeni bir hücre topluluğu olan progenitor Leydig hücreleri interstisyel alanda belirginleşmeye başlar. Sıçan testisinde bu hücreler, ilk kez yaklaşık olarak postnatal 11. günde tanımlanabilir hâle gelir ve LH reseptörü ile birlikte steroid sentezine aracılık eden bazı anahtar enzimleri (Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B) ifade etmeye başlar. Dönemin sonuna doğru progenitor Leydig hücrelerinin sayısında hızlı bir artış gözlenir. Bu hücrelerin yaklaşık olarak postnatal 21. günde sayıca en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Ye ve ark., 2017).

Progenitor Leydig hücrelerinin steroid sentez kapasiteleri sınırlı olduğundan testosteron üretiminde etkili değildirler. Bunun yerine, daha çok dihidrotestosteron (DHT) ve çeşitli 5 α -redükte androjen metabolitlerini sentezledikleri düşünülmektedir. Bu nedenle erken infantil dönemde serum testosteron düzeyleri düşük kalmaya devam eder. Bu dönem, literatürde genellikle “stabil, düşük testosteron fazı” olarak

tanımlanmaktadır. Hipofizyal LH, neonatal dönemden itibaren kanda görülmektedir ve infantil dönemde de görece yüksek kalmaktadır. Ancak fetal Leydig hücrelerinin LH'dan bağımsız çalışması ve yeni oluşan progenitor hücrelerin steroid üretim düzeylerinin yetersiz olması nedeniyle LH etkisi sınırlı kalmaktadır. Öte yandan, artan inhibin üretimi nedeniyle FSH düzeyleri infantil evrede baskılanmış durumda seyretmektedir. Ayrıca, 9. ila 16. günler arasında serum östradiol (E2) düzeylerinde hafif bir artış olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu artışın, maternal kaynaklı östrojenlerin yıkımı veya Sertoli hücrelerindeki aromataz enzim aktivitesindeki dalgalanmalarla ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Prolaktin hormonu ise bu süreçte erkek sıçanlarda anlamlı bir değişim göstermemekte, düşük düzeylerde seyretmektedir (Picut ve ark., 2015).

2.3. Geç İnfantil Dönem (15–20 Gün)

Geç infantil dönem (postnatal gün 15–20), testisin hızlı morfo-işlevsel dönüşüm geçirdiği, germ hücre farklılaşmasının ivme kazandığı ve seminifer epitel organizasyonunun yeni bir düzene geçiş yaptığı kritik bir evredir. Bu dönemde seminifer tübüllerde ilk kez lümen oluşumu gözlenmektedir. Tübüllerin ortasında küçük boşlukların görülmesiyle, neonatal ve erken infantil fazlardaki kord yapısından ayrılarak, gerçek seminifer tübül morfolojisi gelişmeye başlar. Histolojik olarak, 18–20. günler arasında birçok tübülde açıkça tanımlanabilir lümen izlenirken, bazı kaynaklarda bu yapısal dönüşümün 28. gün civarında netleştiği belirtilmektedir. Bu süreç, tübül çapındaki artışla paralel şekilde ilerlemektedir ve testis parankiminde interstisyel doku hacmi görece olarak azalmaktadır. Örneğin, doğumda testisin yaklaşık %36'sını oluşturan interstisyel alan, bu dönemde %20 civarına gerilerken, tübüllerin hacimsel oranı artış göstermektedir. Bu yapısal yeniden organizasyon, germ hücre topluluğundaki dinamik değişimlerle eş zamanlı olarak ilerlemektedir (Dorostghoal ve ark., 2011).

Germ hücreleri açısından değerlendirildiğinde, geç infantil dönem belirgin bir hücresel farklılaşmanın ve seçilimin yaşandığı bir fazdır. Erken infantil evrede proliferatif etkinliği en yüksek seviyeye ulaşan spermatogonyumlar, bu dönemde iki farklı yol izlemektedir. Bir kısmı mitoz geçirerek gelişmeye devam ederken, bir kısmı

apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmaktadır. Literatürde ikinci haftanın sonunda spermatogonyumlara ait mitotik aktivitede belirgin bir azalma ve apoptoz oranında artış gözlemlendiği bildirilmektedir. Bu fizyolojik ortadan kaldırma süreci, aşırı çoğalan germ hücrelerinin ayıklanmasını sağlayarak, seminifer epitelin ileri dönemlerdeki düzenli mimarisinin kurulması açısından temel bir basamaktır. Hayatta kalan spermatogonyumlar, Sertoli hücrelerinin bazalinde tek sıra hâlinde hizalanmaya başlar. Bu sayede infantil döneme özgü “rozet” mimarisi çözülmeye başlar ve seminifer epitelde lineer bir organizasyonun temelleri atılır. Bu evrede, mayoz sürecine katılan hücre topluluğunda da artış görülmektedir. Leptoten ve zigoten evresindeki primer spermatositler, neredeyse tüm tübüllerde izlenebilir duruma gelmiştir (Picut ve ark., 2015).

Özellikle postnatal gün 17–18 civarında tüm tübüllerde zigoten spermatositlerin mevcut olduğu, bunu takip eden günlerde ise erken ve geç pakiten evresindeki hücrelerin art arda ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu gelişim, mayoz I bölünmesinin ilerlediğini göstermektedir. Ancak henüz spermatid oluşumu başlamamıştır. Çünkü haploid germ hücrelerine ait ilk yuvarlak spermatidler ortalama postnatal gün 24–25’te gözlenecektir. Bu nedenle, geç infantil dönemde spermatid evresi temsil edilmez. Bununla birlikte, germ hücre gelişiminin evreler hâlinde ilerlemesi, seminifer epitelde senkronize olmayan bir yapının ortaya çıkmasına neden olur. Aynı anda alınan kesitlerdeki tübüllerin bir kısmında ileri evre spermatositler gözlenirken, bir kısmında spermatogonyumlar halen çoğunluğu oluşturmaktadır (Malkov ve ark., 1998; Picut ve ark., 2015).

Geç infantil dönemde Sertoli hücrelerinin mitotik aktivitesi büyük oranda sonlanmış (Nascimento ve ark., 2016). Üçüncü haftanın başlarında bu hücrelerin sayısal artışı durmakta ve son olgunlaşma sürecine girilmektedir. Sertoli hücre olgunlaşmasının en önemli histolojik göstergelerinden biri, işlevsel kan-testis bariyerinin kurulmasıdır. Literatürde kan-testis bariyerinin postnatal gün 16–19 arasında etkin hâle geldiği ve Sertoli hücreleri arasında gelişen sıkı bağlantılar sayesinde germ hücrelerinin adluminal bölgeye geçişinin sağlandığı bildirilmektedir. Özellikle pakiten evresindeki spermatositlerin bulunduğu bölgelerde Sertoli hücreleri arasında etkili bir bariyer organizasyonu izlenmiştir. Bu yapısal gelişim, testis içinde

her seminifer tübülün kendi gelişim evresine göre farklı zamanda kan testis bariyerinin oluşturduğunu ve bariyer oluşumunun senkronize olmayan bir şekilde ilerlediğini göstermektedir. Kan-testis bariyerinin kurulmasıyla seminifer epitel, bazal ve adluminal olmak üzere iki bölüme ayrılır. Bu ayırım, mayoz sürecindeki germ hücrelerinin immünolojik olarak korunmasını sağlar. Ayrıca bu dönemde Sertoli hücreleri, salgı yapıcı özellik kazanmaya başlar. Özellikle androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi ve lümene sıvı salgılama gibi işlevler kazanarak testisin parakrin mikroçevresini oluşturmaktadır (Bergmann ve Dierichs, 1983).

İnterstisyel alandaki hücre toplulukları açısından değerlendirildiğinde, geç infantil dönem önemli bir geçiş evresidir. Bu dönemde fetal Leydig hücreleri, sayıca büyük ölçüde azalmış olup, işlevsel katkıları ihmal edilebilecek düzeydedir (Kerr ve Knell, 1988). Yerlerini alan progenitor Leydig hücreleri ise bu evrede hızlı bir proliferasyon sürecindedir. Sayıca artışlarının zirve noktasına postnatal gün 21’de ulaşacakları öngörüldüğünden, 15–20. günler arası bu hücrelerin yoğun çoğaldığı dönemdir (Chen ve ark., 2009). Progenitor hücreler, morfolojik olarak iğsi şekilli, küçük boyutlu ve kümelenme eğilimindedir. Bu hücreler, yaklaşık postnatal gün 28–30 itibarıyla daha yuvarlak ve geniş sitoplazmalı immatür Leydig hücrelerine farklılaşmaya başlar. Geç infantil dönemde testosteron üretimi hâlâ düşük seviyededir (Ivell ve ark., 2013; Picut ve ark., 2015). Bunun nedeni, progenitor Leydig hücrelerinin steroid sentezinde testosteron yerine daha çok dihidrotestosteron (DHT) ve diğer 5α -redükte androjen metabolitlerini üretmeleridir. Bu hücrelerde LH reseptörü mevcut olsa da 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesinin zayıf olması nedeniyle sentez ürünleri çoğunlukla DHT gibi metabolitlerdir. Hormonal açıdan değerlendirildiğinde, bu dönemde LH dolaşımında halen bulunmakta ve inhibe edici testosteron geri bildirimi henüz gelişmediği için LH sekresyonu yüksek kalmaktadır. Buna karşın, inhibin üretiminin artması sonucu FSH düzeyleri en düşük seviyesine inmektedir (yaklaşık postnatal gün 18). FSH’daki bu düşüş, Sertoli hücrelerinin aromataz aktivitesini de azaltarak östrojen üretimini sınırlandırmaktadır. Dolayısıyla geç infantil dönemde serum östrojen düzeyleri düşüktür. Prolaktin (PRL) düzeyi ise erkek sıçanlarda bu süreçte düşük kalmaya devam etmekte ve anlamlı bir değişiklik göstermemektedir (Picut ve ark., 2015).

2.4. Juvenil Dönem (21–32 Gün)

Juvenil dönem, postnatal 21. ile 32. günler arasındaki süreci kapsar ve testisin ergenlik öncesi son gelişim evresidir. Bu evrede testiste hem yapısal hem de hücresel düzeyde olgunlaşma belirginleşir. Seminifer tübüller, artık açık lümene sahiptir ve çapları hızla genişlemektedir. Özellikle postnatal gün 35'e yaklaşıldığında testis hacminde ve tübül hacminde dikkat çekici bir artış meydana gelir. Bu hacim artışı, büyük ölçüde seminifer tübül çapının genişlemesiyle ilişkilidir (Dorostghoal ve ark., 2011). Seminifer epitel, artık belirgin şekilde tabakalanmıştır. Bazal membrana bitişik olarak Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar yer alırken, daha üst sıralarda primer ve sekonder spermatositler, lümene yakın bölgelerde ise spermatidler görülmektedir. Özellikle pakiten evresindeki primer spermatositler, büyük çekirdekleri ve lümene yakın yerleşimleriyle histolojik kesitlerde kolaylıkla tanınabilir (Picut ve ark., 2015). Bu dönemde ilk defa haploid germ hücreleri oluşur. Round spermatidler, yaklaşık postnatal gün 24 veya 25 civarında görünür hale gelir. Bu bulgu, birinci mayotik bölünmenin başarıyla tamamlandığını ve spermiogenez sürecinin başladığını göstermektedir. Juvenil dönemin ortalarında round spermatid sayısı hızla artar. Yaklaşık olarak postnatal gün 30'dan itibaren elongasyon sürecine giren spermatidler tanımlanabilir hale gelir. Postnatal gün 35 civarında ise lümende elongated spermatidlerin ve olgun spermatozoaların ilk kez görüldüğü bildirilmektedir (Dorostghoal ve ark., 2011). Bu veriler, birinci spermatogenez dalgasının juvenil dönemde tamamlandığını ve ilk spermiasyon olaylarının başladığını göstermektedir. Histolojik olarak seminifer epitel, erişkin testisine benzer bir düzen kazanır. Bazal membran boyunca tek sıra hâlinde dizilen Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar, daha içeriye doğru düzenli sıralanmış spermatositler ve spermatidler ile birlikte tam katmanlı bir görünüm oluştururlar. Bu yeniden yapılanma, infantil dönemde görülen rozet oluşumlarının kaybolduğunu ve erişkin tip epitel mimarisine geçişin gerçekleştiğini göstermektedir (Picut ve ark., 2015). Bu dönemde kan-testis bariyeri tam anlamıyla işlevseldir. Sertoli hücreleri, artık olgun fenotipe sahip olup bölünmezler ve aralarındaki sıkı bağlantılar sayesinde germ hücrelerini bağışıklık sisteminden izole ederler. Ayrıca Sertoli hücreleri, spermatid gelişimi için gerekli besinleri ve parakrin faktörleri sağlar, lümene sıvı salgılar ve ABP üretir. Aynı

zamanda inhibin salgılamaya devam ederek negatif geribildirim yoluyla FSH düzeylerini düzenler. Bu evrede Sertoli hücre sayısı sabitlenmiştir ve artık testisin Sertoli hücre kapasitesi erişkin döneme kadar değişmeden kalır. Juvenil dönem, Leydig hücre gelişimi açısından da belirleyici bir evredir. Daha önceki evrede sayıca artış gösteren progenitör Leydig hücreleri bu dönemde immatür Leydig hücrelerine dönüşmektedir. Literatüre göre postnatal gün 35 civarında progenitör hücrelerin tamamına yakını immatür Leydig hücresi formuna geçmiştir (Ye ve ark., 2017). Bu hücreler daha büyük, yuvarlak morfolojilidir ve steroidojenik enzim ifadeleri artmıştır. Artık testosteron üretebilir hâle gelmiş olsalar da bu üretim henüz erişkin düzeyde değildir. Steroid metabolizması tam olarak işlevsel olmadığı için testosteron yerine daha çok dihidrotestosteron ve diğer redükte androjenler üretilir (Picut ve ark., 2015).

Endokrin açıdan değerlendirildiğinde, infantil evredeki düşüşün ardından juvenil dönemde FSH düzeylerinde tekrar bir yükselme gözlenir. Özellikle postnatal gün 26 civarında FSH seviyesinin ilk yükselişini yaptığı bildirilmiştir. Bu artış, Sertoli hücrelerinden salgılanan parakrin faktörler aracılığıyla Leydig hücrelerinde LH reseptörü ifadesinin artmasına katkı sağlar. Bu süreçte PRL düzeylerinde de artış olduğu ve Leydig hücrelerinde LH reseptörü düzeyini artırarak LH'nın etkisini güçlendirdiği gösterilmiştir. LH düzeyi ise bu dönemde daha da yükselerek immatür Leydig hücrelerini doğrudan uyarır ve testosteron sentezini artırır. Ancak testosteron düzeyi hâlâ erişkin seviyesinin altında seyretmektedir ve bu hormonun asıl yükselişi pubertal dönemde gözlenir (Nascimento ve ark., 2016; Picut ve ark., 2015; Ye ve ark. 2017).

Juvenil dönemle birlikte seminifer epitel döngüsü tanımlanabilir hâle gelir. Sıçanlarda bu döngü 14 evreden oluşur ve spermatid gelişiminin farklı aşamalarına göre sınıflandırılır. Juvenil evrenin ortasında round spermatidlerin varlığı ile birlikte döngünün ilk evreleri (I-VI) gözlenebilir. Ancak elongasyon evresine ait ileri spermatid basamakları henüz tam gelişmediği için döngünün geç evreleri eksik kalır. Round spermatidlerin 1. ile 8. aşamaları, juvenil dönemde yaygın şekilde gözlenmektedir. Elongating spermatidlerin erken aşamaları (9. ile 15. Aşamalar), yaklaşık olarak postnatal 30. günden itibaren tanımlanabilir hâle gelir. Lümeneye atılmaya hazır durumda olan, tam farklılaşmış elongated spermatidler ise bu dönemde

henüz nadir olarak gözlenmektedir. Bu hücrelerin seminifer epitelde düzenli biçimde izlenmeye başlaması genellikle 5. ile 6. haftalar arasında gerçekleşmektedir (Hess, 1990; Picut ve ark., 2015).

2.5. Peri-Pubertal Dönem (33–55 Gün)

Peri-pubertal dönem (postnatal 33.- 55. gün), erkek sıçanlarda cinsel olgunluğa geçiş sürecini temsil eder. Bu evrede spermatogenez tam olarak tamamlanmakta ve testis yapısı erişkin testisine yakın bir düzen kazanmaktadır. Bu dönemde seminifer tübülleri, maksimum çaplarına ulaşmaya başlar. Özellikle 5. ve 6. haftalarda tübül çapında hızlı bir artış görülür ve 7. ile 8. hafta arasında erişkin düzeyine yaklaşır. Tübül lümenleri genişlemiş, seminifer epitel kalınlığı maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu süreçte testis hacmi hızla artar; postnatal 35. gün ile 42. gün arasında yaklaşık üç kat büyüme gözlenmiştir. İnterstisyel alanın oranı azalmış, seminifer tübülleri testis parankiminin büyük kısmını kaplamaya başlamıştır (Dorostghoal ve ark., 2011).

Bu dönemde seminifer epitelde tüm spermatogenezis aşamaları aynı anda gözlenir. Spermatogonyumlar yenilenmeye devam ederken, spermatositler mayozu tamamlamakta ve spermatidler olgunlaşmaktadır. Elongasyon süreci tamamlanmış, tam farklılaşmış elongated spermatidler görünür hale gelir. Postnatal 46. günde seminifer epitelin VII. evresinde 19. aşamadaki spermatidler tanımlanabilmiştir (Picut ve ark., 2015). Bu, yaklaşık 6. hafta itibarıyla olgun spermatidlerin spermiyasyon için hazır olduğunu göstermektedir. Nitekim postnatal 36. günden itibaren seminifer tübül lümeninde serbest spermatozoa varlığı histolojik olarak gösterilmiştir. Bu gözlem, testiste işlevsel sperm üretiminin peri-pubertal dönem içerisinde başladığını ortaya koymaktadır. Sürecin ilerleyen evrelerinde ise hem spermatozoa sayısında hem de morfolojik bütünlük açısından kalitesinde artış meydana gelmektedir ve böylece erkek sıçanlar, fizyolojik olarak tam fertil kapasiteye ulaşmaktadır (Picut ve ark., 2015).

Sertoli hücreleri, bu süreçte tam anlamıyla olgunlaşmış durumdadır. Artık bölünmezler ve birbirleriyle sıkı bağlantılar kurarak kan-testis bariyerini oluşturan işlevsel yapıyı sağlamlaştırırlar. Sertoli hücreleri spermatidlerin gelişimini destekler, besin sağlar, lümene sıvı salgılar ve ABP sentezler. Ayrıca inhibin salgılamaya devam

ederek negatif geribildirim yoluyla hipofizden FSH salgısını düzenlemektedirler. Sertoli hücre sayısı sabitlendiğinden, bu dönemde inhibin düzeyleri ile FSH arasındaki denge sağlanmıştır (Picut ve ark., 2015).

Leydig hücreleri açısından bakıldığında bu dönem, son farklılaşma sürecini temsil eder. Daha önce immatür olan hücreler büyüyerek matür Leydig hücrelerine dönüşür. Araştırmalar, postnatal 56. gün civarında immatür hücrelerin çoğunun matür forma geçtiğini göstermektedir. Bu hücreler artık yüksek düzeyde testosteron sentezleme kapasitesine sahiptir. Sitoplazmalarında yeterli miktarda lipid bulunmaz ve büyük, çokgen şekilli hücreler hâline gelmişlerdir. Testosteron düzeyi 7. ile 8. hafta arasında belirgin şekilde artar ve postnatal 90. gün civarında erişkin düzeyine ulaşır. LH, bu dönemde en etkili hormondur. LH salınımı artmış ve pulsatil özellik kazanmıştır. Bu özellik, Leydig hücrelerinde steroid üretimini ve matürasyonu uyarır. PRL düzeyleri de yükselmekte ve LH etkisini destekleyerek Leydig hücrelerinin testosteron üretme kapasitesini artırmaktadır. FSH ise bu dönemde iki belirgin artış gösterir. Bunlardan ilki postnatal 26. günde, diğeri ise 45. gün civarında gözlenmiştir. İlk artış Leydig hücre olgunlaşmasını desteklerken, ikinci artış spermatogenezin son evrelerinin tamamlanmasına ve spermiyasyona katkıda bulunur. Bu evrelerin ardından FSH düzeyi düşüşe geçerek erişkin düzeylere ulaşır (Picut ve ark., 2015; Ye ve ark., 2017).

Peripubertal dönemde sıçan testisinde seminifer epitelin döngüsel organizasyonu (Evre I–XIV) tam anlamıyla oturmuş durumdadır. Bu evreler, ilk olarak Leblond ve Clermont (1952) tarafından tanımlanmış olup, her biri belirli bir germ hücresi dizilimi ve spermatid gelişim düzeyine karşılık gelmektedir (Leblond ve Clermont, 1952). Artık seminifer tübüllerin her histolojik kesiti, bu döngüsel evrelerden birine denk düşer. Nitekim postnatal 46. gün itibarıyla yapılan histolojik gözlemlerde, Evre VII durumundaki tübüllerde spermatid farklılaşmasının en ileri noktasına (19. aşamaya) erişen spermatidlerin bulunduğu saptanmıştır. Bu spermatidler, nükleus yoğunlaşmasını tamamlamış, flagellum gelişimini bitirmiş, akrozomları şekillenmiş ve spermatozoa olarak atılmaya hazır hücrelerdir. Takip eden Evre VIII'de ise bu hücreler spermiyasyon adı verilen süreçle seminifer epitelden serbest kalarak tübül lümenine bırakılır ve serbest spermatozoa hâlini alırlar. Bu

dönemde seminifer epitelde spermatogenezin kesintisiz ve döngüsel olarak sürdüğü, histolojik olarak net biçimde gözlemlenebilmektedir. Aynı anda testisin farklı bölgelerinde epitelin farklı evrelerinin bulunması, sperm üretiminin senkronize olmayan bir şekilde ilerlediğini ve bu sayede sürekli olarak olgun sperm üretildiğini göstermektedir. Bu yapısal düzenin en önemli göstergelerinden biri, spermatidlerin tüm gelişim basamaklarının (1–19) aynı anda testiste bulunabilir hâle gelmesidir. Yuvarlak spermatidler gelişimlerinin 1–8. basamakları arasında yer almakta, elongasyon sürecine giren spermatidler 9–15. basamaklarda bulunmaktadır (Picut ve ark., 2015). Son olarak, çekirdek yoğunlaşması ve morfolojik olgunluğunu tamamlamış spermatidler ise 16–19. basamaklar arasında tanımlanır. Özellikle 19. basamaktaki spermatidler, Evre VII sonunda en apikalde yer almakta ve Evre VIII’de lümenle geçerek spermatozoa hâline dönüşmektedir. Sıçan testisinde seminifer epitelin tam bir döngüsünün süresi yaklaşık 12,9 gündür. A1 tipi spermatogoniumun farklılaşarak 19. basamaktaki olgun spermatide ulaşması ve sperm olarak lümenle bırakılması ise yaklaşık 52 gün sürmektedir. Bu nedenle, peripubertal dönemde başlayan bu tam döngüsel spermatogenez süreci, pubertal dönemde süreklilik kazanmakta ve erişkin bir erkek sıçan testisinde yaklaşık her 13 günde bir tüm epitel evrelerinin tamamlandığı yeni bir sperm üretim döngüsü gerçekleşmektedir (Xiao ve ark., 2014).

2.6. Geç Ergenlik Dönemi (Postnatal 56. Gün sonrası)

Pubertal dönem, yaklaşık 8. haftadan itibaren erkek sıçanın cinsel olgunluğa ulaştığı evreyi temsil eder. Bu dönem, aynı zamanda genç erişkinlik dönemi olarak da tanımlanabilir. Testis histolojisi, bu dönemde erişkin erkek sıçanın yapısal özelliklerini tamamen yansıtır. Seminifer tübüller maksimum çapa ulaşır. Wistar sıçanlarda ortalama 300 mikrometre tübül çapı bildirilmektedir. Lümenler, olgun spermatozoa ile doludur. Artık seminifer epitelde tüm germ hücreleri düzenli biçimde ve sürekli olarak üretilmektedir. Bu hücreler arasında A tipi ve B tipi spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler, round spermatidler, elongating spermatidler, elongated spermatidler ve olgun spermatozoalar yer alır. Spermatogenez, testiste kesintisiz bir biçimde ilerler. Bir seminifer tübülde spermatogonyumlar bölünürken, komşu tübülde spermatozoalar lümenle bırakılır. Bu konumsal-zamansal organizasyon, “seminifer

epitel dalgası” olarak tanımlanır ve her evrenin ardışık olarak testis boyunca yayıldığını ifade eder. Histolojik olarak, her seminifer tübül kesitinde farklı bir epitel evresi izlenir ve bu durum testiste sürekli sperm üretiminin sürdüğünü gösterir (Dorostghoal ve ark., 2011).

Sertoli hücreleri, pubertal dönemde artık tam olgunluğa ulaşmış durumdadır. Hücre sayısı sabittir ve bu sayı değişmeden kalır. Literatürde, sıçan testisinde yaklaşık olarak 30 milyon Sertoli hücresi bulunduğu belirtilmiştir. Bu hücreler, spermatogenezin düzenli biçimde ilerleyebilmesi için uygun bir yapısal ve işlevsel mikroçevre sağlar. Sertoli hücreleri, ABP salgılayarak tübül içi testosteron düzeyini yüksek tutar. Ayrıca spermatidlerin şekillenmesi, fazla sitoplazmalarının fagositozu, kan-testis bariyerinin kontrollü açılıp kapanması gibi süreçleri yönetir. İnhibin-B üretimi yoluyla hipofiz FSH salınımı üzerinde düzenleyici rol oynar. Bu dönemde inhibin ve FSH düzeyleri arasında dengeli bir geri bildirim sistemi kurulmuştur. PRL düzeyleri ise erişkin sıçanlarda fizyolojik düzeyde kalır ve LH reseptör ifadesinin destekleyerek testosteron üretimine katkı sağlar. Ancak bu etkinin sınırlandırıcı olduğu, yani PRL düzeyindeki fizyolojik artışın Leydig hücreleri üzerindeki etkisinin sınırlı olduğu bilinmektedir (Picut ve ark., 2015).

Leydig hücreleri, pubertal dönemde tam olgunluk kazanır. Bu hücreler, artık olgun şekildedir ve erişkin düzeyde testosteron üretimi gerçekleştirmektedir. Sıçanlarda postnatal 90. gün civarında serum testosteron düzeyi en yüksek düzeye ulaşır. Bu düzeyden itibaren genç erişkin sıçan cinsel işlevlerini sürdürebilecek hormonal donanıma sahiptir. Tamamen işlevsel hale gelen Leydig hücreleri, morfolojik olarak büyük, çokgen şekilli ancak sitoplazmaları az lipid içeren hücrelerdir. Fetal dönemde kümeler halinde bulunan fetal Leydig hücrelerinin aksine, olgun hücreler testis interstisyumunda tek tek ya da küçük gruplar halinde yer alır. LH ve PRL tarafından düzenlenen testosteron üretimi, hipotalamus-hipofiz eksenini negatif geri bildirim yoluyla dengelemektedir. Testosteron, hipotalamusta gonadotropin salgılatıcı hormon salınımını, hipofizde ise LH ve FSH salınımını baskılar. Aynı zamanda inhibin üretimi de FSH üzerinde düzenleyici etki gösterir. Bu mekanizmalar sayesinde pubertal dönemde hormonal denge sağlanmış olur (Nascimento ve ark., 2016).

Seminifer epitel döngüsü pubertal dönemde tamamen düzenlenmiş hâle gelir. Artık testisteki her seminifer tübül kesiti, Leblond ve Clermont (1952) tarafından tanımlanan 14 evreden birine karşılık gelir. Sıçan testisinde seminifer epitel döngüsünün süresi yaklaşık 12,9 gündür (Aire, 1980; Xiao ve ark., 2014). Bu süre boyunca her gün farklı tübüllerde farklı evreler gözlenmekle birlikte testis genelinde sürekli sperm üretimi devam eder. Her evre, belirli spermatid aşamaları ile karakterizedir. Örneğin, evre I'de round spermatidler 1. aşamada yer alırken, evre VIII'de spermiyasyon gerçekleşir ve elongated spermatidlerin 19. aşamadaki formları lümene bırakılır (Aire, 1980; Xiao ve ark., 2014). Spermatid farklılaşmasının tüm aşamaları (1. aşamadan 19. aşamaya kadar olan gelişim basamakları) kesintisiz bir şekilde gerçekleşir. Bu sürece golgi, kap, akrozom ve olgunlaşma fazları eşlik eder. Pubertal testiste 19. aşamadaki elongated spermatidler evre VII'de izlenirken, evre VIII'de bu hücrelerin spermatozoa olarak lümene atıldığı görülür. Bu olgun spermatozoalar, epididimise geçerek fertilizasyon yeteneği kazanır. Pubertal dönemde gözlenen diğer bir özellik ise dış cinsel olgunluk belirtilerinin ortaya çıkmasıdır. Erkek sıçanlarda prepusiyal ayrılma (prepusyumun glans penisten ayrılması), genellikle postnatal 42. gün ile 48. gün arasında tamamlanır. Bu değişim, pubertenin klinik bir belirteci olarak kabul edilir. Pubertal dönem tamamlandığında sıçan artık üreme açısından tam olgunluğa ulaşmış sayılır. Testis yapısı, bu aşamadan sonra ileri yaşlara kadar büyük ölçüde sabit kalır. Yaşlanmayla birlikte bazı dejeneratif değişiklikler görülebilse de pubertal dönem sonrasında testis histolojisi erişkin düzeyde sabitlenmiştir (Picut ve ark., 2015).

2.7. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel metabolizmanın doğal bir yan ürünü olarak hem enzimatik hem de enzimatik olmayan yollarla oluşan oksidan moleküllerdir. Düşük düzeyde üretildiklerinde hücrel sinyal iletiminde görev alarak hücre büyümesi, farklılaşması ve adaptif gen ifadesi gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine katkı sağlarlar. Ancak ROS düzeyleri arttığında ve denetim dışı kaldığında, oksidatif stres meydana gelir. Bu durum, hücrede redoks dengesinin bozulmasına ve sonucunda DNA hasarı, proteinlerin oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerin ortaya çıkmasına yol açar. Uzun süreli oksidatif

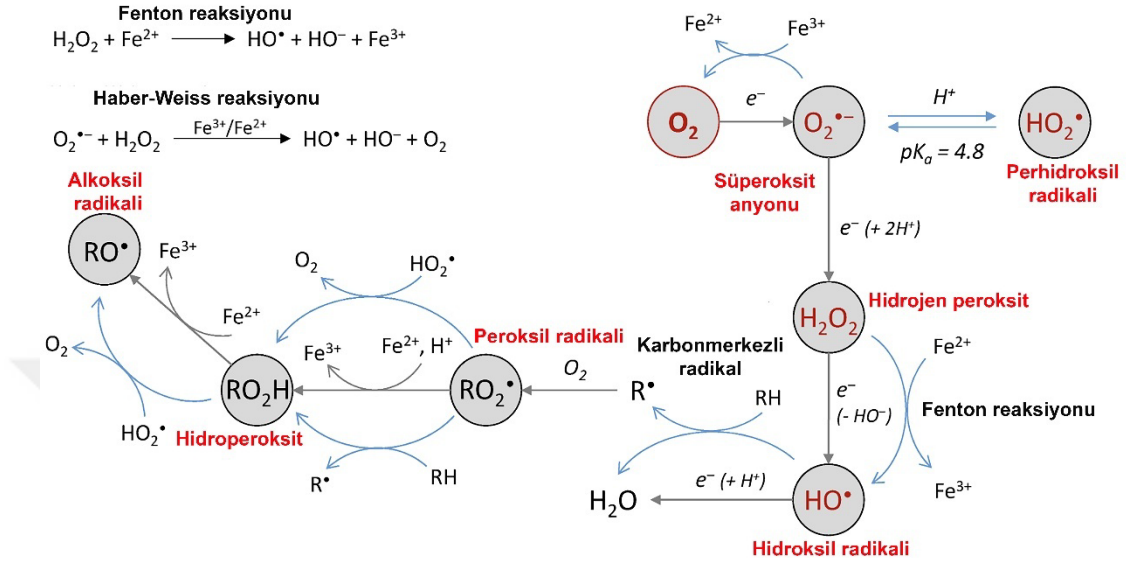
stres, başta kanser olmak üzere kardiyovasküler, nörodejeneratif ve dejeneratif hastalıklara zemin hazırlar (Hong ve ark., 2024; Shu ve ark., 2023). Hücreler bu zararlı etkilerle baş edebilmek için hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan sistemler geliştirmiştir. Bu sistemlerin temel bileşenlerinden biri de glutatyon S-transferazlar (GST'ler) olarak bilinen detoksifikasyon enzimleridir. GST'ler, indirgenmiş glutatyonu (GSH) elektrofilik bileşiklere konjuge ederek bu zararlı moleküllerin etkisiz hale getirilmesini sağlar. GST ailesi, alfa, mu, pi, theta, kappa ve zeta olmak üzere çeşitli sınıflara ayrılır (Yang ve ark., 2001).

2.8. ROS Üretim Kaynakları ve Oluşum Mekanizmaları

Hücreler, oksijenli solunum sürecinde çeşitli ROS molekülleri üretir. En önemli içsel kaynak mitokondrilerdir. Elektron taşıma zincirinde NADH ve FADH₂'den oksijene elektron aktarılırken, bazı elektronlar sızarak moleküler oksijenle reaksiyona girer ve süperoksit anyonu (O₂•⁻) oluşur. Ayrıca bağışıklık hücrelerinde bulunan NADPH oksidaz enzimleri, savunma amacıyla süperoksit üretmek üzere özel olarak görev yapar. Peroksizomlarda ise yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında hidrojen peroksit (H₂O₂) açığa çıkar. Endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi (ER stresi) de ROS üretimini tetikleyen bir diğer içsel kaynaktır (Miguel-Jiménez ve ark., 2021; Shu ve ark., 2023; Yang ve ark., 2001).

ROS üretimi yalnızca enzimatik süreçlerle sınırlı değildir. Ultraviyole (UV) ışınlar, iyonlaştırıcı radyasyon ve çeşitli kimyasallar, enzimatik olmayan yollarla da ROS oluşumuna neden olabilir. Ağır metaller ve ksenobiyotik toksinler, oksijen moleküllerinin kısmi indirgenmesini kolaylaştırarak süperoksit veya hidrojen peroksit üretimini artırabilir. Özellikle demir (Fe²⁺) ve bakır (Cu⁺) gibi geçiş metalleri varlığında, hidrojen peroksit çok reaktif bir tür olan hidroksil radikaline (OH•) dönüşebilir. Bu dönüşüm, Fenton reaksiyonu olarak bilinir ve ROS'ların en zararlı formlarından biri olan OH•'un oluşumunda kritik rol oynar (Şekil 2.1). ROS yalnızca hücre içinde değil, dış kaynaklarla da organizmaya girebilir. Sigara dumanı, hava kirliliği, pestisitler, ilaçlar ve çeşitli endüstriyel kimyasallar vücuda alındığında metabolik yıkım süreçlerinde ROS oluşumunu artırabilir. Hem endojen hem de eksojen kaynaklı ROS'lar, hücre içinde birikerek lipid peroksidasyonu, DNA kırıkları,

protein yapılarının bozulması, apoptoz ve otofaji gibi süreçleri başlatabilir. Hücreler, bu tür hasarları sınırlamak amacıyla savunma sistemlerini aktif hale getirir (Collin, 2019; Hong ve ark., 2024).



Şekil 2.1. Reaktif oksijen türleri oluşumunun kimyasal temeli (Collin, 2019).

2.9. ROS Sınıflandırılması ve Yapısal Özellikleri

ROS, belirli bir molekülden ziyade, kimyasal olarak birbirine benzeyen ve oksijen içeren reaktif molekülleri kapsayan bir grubu ifade eder. Bu gruba giren moleküller, hücresel oksijen metabolizması sırasında oluşur ve biyolojik sistemlerde önemli etkilere sahiptir. ROS molekülleri genel olarak iki ana gruba ayrılır: Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türler (Shu ve ark., 2023).

Serbest radikal ROS'lar, yapılarında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve bu nedenle yüksek kimyasal reaktiviteye sahip moleküllerdir. Bu grubun başlıca üyeleri arasında süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), organik peroksil radikali ($\text{ROO}^\bullet$) ve alkoksil radikali ($\text{RO}^\bullet$) yer alır. Örneğin, süperoksit anyonu, moleküler oksijenin tek elektronla indirgenmiş hâlidir ve genellikle mitokondriyal solunum zinciri sırasında oluşur. Hidroksil radikali ise biyolojik sistemlerde bilinen en reaktif oksijen türevidir ve neredeyse tüm biyomoleküllerle kontrolsüz reaksiyona girme potansiyeline sahiptir. $\text{ROO}^\bullet$ ve $\text{RO}^\bullet$ gibi diğer radikaller

ise çoğunlukla lipid peroksidasyonu gibi zincir reaksiyonları sırasında meydana gelir (Hong ve ark., 2024). Diğer taraftan radikal olmayan ROS'lar, yapılarında eşleşmemiş elektron içermemesine rağmen kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Bunların başında hidrojen peroksit (H_2O_2) gelir. Hidrojen peroksit doğrudan bir serbest radikal değildir, ancak biyolojik sistemlerde ROS sınıfına dahil edilir; çünkü kolaylıkla daha reaktif türlere dönüşebilir. Diğer bir radikal olmayan ROS örneği ise singlet oksijen (1O_2)'dir. Singlet oksijen, yüksek enerjili bir molekül formu olup eşleşmemiş elektronu olmamasına rağmen yüksek oksidatif potansiyele sahiptir (Shu ve ark., 2023).

Moleküler oksijen (O_2) biyolojik ortamda çift eşleşmemiş elektrona sahip bir biradikal olarak bulunur. Bu özellik, onu tek elektronlu indirgenme reaksiyonlarına uygun hâle getirir. Örneğin, bir elektron kazandığında O_2 , süperoksit anyonuna ($O_2^{\bullet-}$) dönüşür. Süperoksit daha sonra süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından dismutasyona uğratarak hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilir. H_2O_2 ise katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından suya indirgenebilir. Bununla birlikte, hücre içinde demir (Fe^{2+}) veya bakır (Cu^+) gibi redoks aktif metallerin varlığında Fenton reaksiyonu gerçekleşebilir ve H_2O_2 , hidroksil radikaline ($OH^{\bullet}$) dönüşebilir. Bu şekilde, ROS türleri birbirine dönüşebilen dinamik bir yapıya sahiptir. Örneğin süperoksit $\rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet}$ dönüşüm zinciri hücrede yaygın olarak gözlenen bir süreçtir (Hong ve ark., 2024).

ROS moleküllerinin yapısal özellikleri, biyolojik reaktivitesini belirler. Süperoksit anyonu negatif yüklüdür ve hücre zarlarından geçişi sınırlıdır ve reaktivitesi nispeten düşüktür. Buna karşın hidroksil radikali nötr yapıda olup son derece kısa ömürlü ve güçlü bir oksidan ajandır. Hidrojen peroksit ise polar bir molekül olup hücre zarlarını geçebilse de tek başına çok reaktif değildir. Bununla birlikte metal iyonlarıyla etkileşime girmesi durumunda daha tehlikeli radikallerin oluşumuna neden olabilir (Shu ve ark., 2023).

2.10. ROS'un Reaktivite Mekanizmaları ve Biyolojik Etkileri

ROS molekülleri, yüksek reaktiviteleri nedeniyle biyomoleküllere saldırarak oksidatif modifikasyonlara yol açar. Özellikle lipid peroksidasyonu (LPO) ROS

hasarının zincirleme bir örneğidir. Hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), hidroksil radikali gibi ROS tarafından hedef alınır. OH•, bir lipid zincirinden hidrojen çekerek lipid radikali oluşturur ve bu radikal, oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini (ROO•) oluşturur. Peroksil radikalleri zincir reaksiyonunu sürdürerek bitişik yağ asitlerini de okside eder ve sonuçta membranda yaygın peroksidatif hasar oluşur. Bu süreç, antioksidanlarla (örneğin E vitamini gibi lipofilik antioksidanlar) veya enzimatik mekanizmalarla durdurulmazsa, membran bütünlüğü bozulur ve hücre işlevleri zarar görür. Nitekim ROS kaynaklı lipid peroksidasyonu, hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini değiştirerek hücre yaşamını tehdit eder (Mannucci ve ark., 2022). ROS, aynı zamanda DNA ve proteinlere de zarar verir. Hidroksil radikali, DNA bazlarına ve deoksiriboz şekerine doğrudan saldırarak baz modifikasyonları, tek sarmal ya da çift sarmal kırıkları oluşturabilir. Bunun sonucunda mutasyonlar ve genomik kararsızlık ortaya çıkabilir. Proteinlerde, ROS özellikle sülfidril gruplarına (–SH) sahip sistein ve metiyonin gibi amino asitleri okside eder. Enzimlerin aktif merkezlerindeki kritik tiyol gruplarının oksidasyonu, bu proteinlerin inaktivasyonuna veya işlevlerinin değişmesine yol açabilir. Ayrıca proteinlerin omurgasında oksidatif kırılmalar ya da yan zincirlerde karbonilasyon gibi kalıcı modifikasyonlar gerçekleşebilir. Bu tür modifikasyona uğramış proteinler genellikle işlev kaybeder veya proteazlar tarafından yıkıma gönderilir (Ardestani ve Yazdanparast, 2007).

ROS düzeyi fizyolojik konsantrasyonu aştığında hücre, ROS'un bu zararlı etkilerini önleyen antioksidan sistemlerini devreye sokar. Enzimatik antioksidanlar arasında SOD (süperoksit dismutaz), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler bulunur. Bunlar enzimler süperoksit, hidrojen peroksit ve organik peroksitleri daha zararsız ürünlere indirger. Non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E, vitamin C, glutatyon, ürik asit gibi küçük moleküllerdir ve ROS'u doğrudan etkisizleştirebilir. Örneğin askorbik asit (C vitamini) elektron vererek serbest radikalleri nötralize eder ve alfa-tokoferol (E vitamini) membran lipid fazında zincir kırıcı antioksidan rolü oynar. Antioksidan savunmanın etkinliği, ROS düzeylerinin zararsız tutulmasında kritiktir. Aksi takdirde, oksidatif stres gelişir ve bu durum erkek infertilitesi gibi birçok

hastalığın patogeneğinde yer alır (Barati ve ark., 2020; Hong ve ark., 2024; Yang ve ark., 2001).

Redoks aktif metal katyonları, ROS oluşumunda özel bir yere sahiptir. Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi geçiş metalleri, değışken değerlikli yapılarıyla elektron transferine aracılık ederek ROS üretimini artırabilirler. Özellikle Fe^{2+} iyonu, Fenton reaksiyonu vasıtasıyla hidrojen peroksitle reaksiyona girerek Fe^{3+} , hidroksil radikali ($OH\bullet$) ve hidroksit iyonu (OH^-) oluşturur. Bu reaksiyon, vücutta serbest demir varlığında en zararlı ROS türü olan $OH\bullet$ 'ün üretilmesindeki başlıca mekanizmadır. Benzer şekilde süperoksit anyonu da Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} formuna indirger ve Fenton reaksiyonunu besleyen bir döngü oluşturur (Haber-Weiss döngüsü). Bu nedenle organizma, serbest demir ve bakır iyonlarını minimuma indirmek için güçlü metal bağlayıcı proteinler (ferritin, transferrin, seruloplazmin vb.) kullanır. Örneğin, demirin ferritin içinde depolanması, Fe^{2+} 'ın serbestçe dolaşarak Fenton reaksiyonu başlatmasını engeller. Ağır metaller (kadmiyum, kurşun gibi) doğrudan Fenton reaksiyonu oluşturmaları da glutatyonu tüketerek veya antioksidan enzimleri inhibe ederek dolaylı olarak oksidatif strese neden olabilirler. Özetle, redoks aktif metalleri kontrol altında tutan mekanizmalar, ROS düzeylerinin yönetilmesi ve hücrel bütünlüğün korunması açısından hayati önem taşımaktadırlar (Barati ve ark., 2020; Ghiselli ve ark., 2000).

2.11. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimleri ve Özellikleri

2.11.1. GST Ailesine Genel Bakış

Glutasyon S-transferazlar (GST'ler), hücrel detoksifikasyonda rol alan faz II enzimleri süperfamilsine ait olup, temel reaksiyonları GSH'nin elektrofilik bileşiklere konjugasyonunu katalizlemektir. Bu sayede GST'ler, hücrede oluşan veya dışarıdan alınan toksik elektrofilik molekülleri suda çözünebilir ve atılabilir türevlerine dönüştürerek zararsız hale getirir. İnsanlarda ve memelilerde GST ailesi, genetik ve yapısal olarak ayrılmış birkaç sınıfa ayrılır: Alfa, Mu, Pi, Theta, Kappa ve Zeta başlıca sınıflardır. Bu sınıfların her biri farklı genlerle kodlanan izoenzimleri içerir ve farklı substrat spesifikliklerine sahip olabilirler (Yang ve ark., 2001).

GST enzimleri, genellikle homodimerik yapıda sitozolik proteinlerdir. Her bir monomer yaklaşık 23–28 kDa büyüklüğündedir ve aktif enzim, iki monomerin birleşmesiyle oluşur. Her monomer, glutasyonu bağlayan G-bölgesi denilen koruyucu bir cep ve hidrofobik substratı bağlayan H-bölgesi denilen ikinci bir bölgeden oluşur. GST kataliz mekanizmasında G-bölgesi, GSH'nin tiyolat formunu stabilize ederken; H-bölgesi, elektrofilik substratın uygun konumda tutulmasını sağlar. Böylece GSH'nin sülfidril grubu substrata nükleofilik saldırı yapar ve konjugat ürünü oluşur (Ferreira ve ark., 2023).

Bazı GST izoenzimleri, klasik GSH konjugasyonunun ötesinde enzimatik faaliyetler gösterebilir. Örneğin, alfa sınıfı GST'lerin insan karaciğerinde, GSH kullanarak organik peroksitleri indirgedikleri ve selenyumdan olarak bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi sergiledikleri tespit edilmiştir. Bu, GST'lerin oksidatif stres ürünlerinin (örn. lipid hidroperoksitlerin) detoksifikasyonunda da rol alabildiğini göstermektedir. Yine de bu peroksidaz aktivitesinin asıl olarak alfa sınıfında belirgin olduğu ve theta gibi diğer sınıflarda daha zayıf olduğu bilinmektedir. GST ailesi üyeleri, yaygın olarak karaciğer, böbrek, akciğer gibi detoksifikasyonun önemli olduğu organlarda yüksek düzeyde ifade edilir. Bunun yanında, pek çok GST izoformu dokuya özgü işlevler de üstlenebilir. GST'lerin ifadesi indüklenebilir özellik taşır. Örneğin bazı ksenobiyotikler veya oksidatif stres durumları Nrf2 gibi transkripsiyon faktörleri üzerinden GST genlerinin ifadesini artırabilir. Bu adaptif yanıt, hücrenin zararlı bileşiklere ve oksidan stresine karşı hazırlıklı olmasını sağlar (Yang ve ark., 2001).

GST'lerin testis ve epididimideki dağılımları ve işlevlerine yönelik çalışmalar, GST'lerin spermatozoalarda türe-özgü ve olgunlaşma durumuna bağlı olarak farklı düzeylerde ifade edildiğini ve lokalize olduğunu göstermektedir. Spermde GST varlığı ilk kez insan, sıçan ve farede gösterilmiş; daha sonraki çalışmalar ise farklı türlerde de sperm ve erkek üreme sistemi dokularında çeşitli GST izoformlarının bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu enzimlerin, sperm çekirdeğinin dekonduksasyon sürecinde glutasyon (GSH) ile birlikte rol aldığı bildirilmiştir. Epididimal olgunlaşma ve kapasitasyon süreçleri boyunca GST'ler, spermin fizyolojik gereksinimlerini karşılamak ve oksidatif dengeyi sağlamak açısından kritik görevler

üstlenmektedir. Sperm plazma membranında çeşitli antioksidan enzimler yer alsa da, erkek üreme sistemi boyunca epididimis ve seminal veziküller başta olmak üzere birçok yapı reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürücü salgılar üretmektedir. Nitekim, sıçan seminifer tübüllerinde GST salgılanımı gösterilmiş; insan testisinde ise GSTP, GSTA ve GSTM izoformlarının immünohistokimyasal boyama ile Sertoli ve Leydig hücrelerine özgü olarak lokalize olduğu belirlenmiştir. Rodent modellerinde Sertoli hücrelerinin, belirli GST izoformları ve GSH sentezi aracılığıyla germ hücrelerinin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, fare germ hücrelerinin de GST ürettiği bildirilmiştir. Örneğin, GSTM2 izoformu tip A ve B spermatogonyumlarda yüksek oranda ifade edilirken, olgun germ hücrelerinde bu ifade belirgin şekilde azalmaktadır. Benzer şekilde, farelerde GSTM2 ifadesinin testis gelişimi sürecinde kademeli olarak azaldığı; Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlarda daha yüksek, spermatositler ve spermatidlerde ise daha düşük düzeyde olduğu rapor edilmiştir. Her ne kadar testiste GST ifadesine ilişkin bulgular arasında bazı çelişkiler bulunsa da, insan epididimal sıvısının proteom analizleri bölgeye özgü GST izoform ifadelerinin varlığını göstermektedir. Buna göre, GSTP1 ve GSTM3 korpus ve kauda bölgelerinde yüksek oranda bulunurken, GSTM2, GSTM5 ve GSTO1 kaput bölgesinde daha yoğun ifade edilmektedir. GSTM2-3 ve GSTP1'in epididimis membranlarında lokalize olduğu; GSTM2-3 ve GSTM5'in ise epididimal lümen içerisinde kaput bölgesinden distale taşınma sürecinde sperm membranına bağlandığı öne sürülmüştür. Bu bağlamda, epididimal salgıların, sperm olgunlaşmasında rol alan ve lümen boyunca taşınarak sperm yüzeyine bağlanabilen GST izoformlarını içerdiği anlaşılmaktadır. Sperm yüzeyinde bulunan GST'lerin oksidatif strese (OS) karşı koruma sağladığı ve epididimal depolama sürecinde sperm canlılığını desteklediği düşünülmektedir. Seminal veziküller de önemli bir antioksidan kaynağı olup GSTM3 ve GSTP1 izoformlarını içermektedir. Ayrıca prostat bezi, prostazomlar aracılığıyla GSTP1 salgılamakta; GSTP1'in anormal metilasyonunun prostat tümörlerinin %90'ından fazlasında görülmesi, bu enzimi potansiyel bir prostat kanseri biyobelirteci hâline getirmektedir. Sonuç olarak, erkek üreme sisteminin farklı bölgelerinde GST'lerin sentezlenmesi ve salgılanması, bu enzim ailesinin erkek fertilitesinde önemli ve çok yönlü roller üstlendiğini; testislerde ise özellikle germ hücrelerini oksidatif strese karşı koruyarak sağlıklı spermatogenezin sürdürülmesinde

kritik işlevlere sahip olabileceğini göstermektedir (Mukhtar ve ark., 1978; Klys ve ark., 1992; Aravinda ve ark., 1995; Fulcher ve ark., 1995; Mukherjee ve ark., 1999; Zu ve ark., 2003; Paz ve ark., 2006; Dacheux ve ark., 2009; Li ve ark., 2010; Batruch ve ark., 2011; Llavanera ve ark., 2019).

2.11.2. GSTK1: Yapısal ve İşlevsel Özellikler

Glutasyon S-transferaz Kappa 1 (GSTK1), GST süper ailesinin diğer üyelerinden belirgin farklılıklar gösteren bir izoenzimdir. GSTK1 genetik olarak ayrı bir Kappa sınıfını temsil eder ve insan genomunda 7q34 bölgesinde lokalizedir ve 8 ekzonlu bir yapıya sahiptir. GSTK1 proteini, çoğu GST'nin aksine sitozolde değil, büyük ölçüde organel lokalizasyonuna sahiptir: C-terminalindeki -Ala-Arg-Leu dizisi peroksizomal hedefleme sinyali sayesinde hem peroksizomlara hem de mitokondriyal matrikse yönlendirilir. Bu eşsiz lokalizasyon, GSTK1'i glutasyon metabolizmasının bilinen tek peroksizomal enzimi haline getirmektedir. Yapısal olarak GSTK1, diğer GST sınıflarından farklı bir katlanma düzeni sergiler: Protein, tiyoredoksin benzeri bir çekirdek yapıya ve bunun üzerinde yer alan çok sayıda α -helikal uzantıya sahiptir. Bakteriyel izomeraz enzimlerine yapısal benzerlik gösteren bu katlanma motifi, GSTK1'in geleneksel GST'lerden evrimsel olarak ayrıştığını göstermektedir (Costa ve ark., 2023).

GSTK1'in katalitik özellikleri kendine has olup diğer GST'lere kıyasla klasik GST substratları (örn. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen, CDNB) ile aktivitesi düşüktür. Bu düşük katalitik aktivite, GSTK1'in daha spesifik veya henüz tam anlaşılamamış farklı reaksiyonlarda rol alabileceğini düşündürmektedir. Nitekim bazı çalışmalar, GSTK1'in yağ asidi metabolizması ve enerji homeostazıyla ilişkili olabileceğini öne sürmüştür. Peroksizomlardaki konumu gereği, α -oksidasyon ve β -oksidasyon yollarında oluşan reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunda görev alabilir. Dahası, glutasyon peroksidaz benzeri bir aktivite sergilediği düşünülerek GSH ile organik hidroperoksitleri indirgemedede rol alabileceği belirtilmiştir (Ferreira ve ark., 2023).

HücreSEL işlev açısından GSTK1, mitokondriyal işlevlerin sürdürülmesi ve redoks homeostazın dengelenmesinde önemli görülmektedir. Örneğin, tip 2 diyabetli

hastaların kan hücrelerinde GSTK1 ifadesinin azaldığı; bunun da mitokondriyal işlev bozukluğu ve kronik inflamasyon belirteçleriyle ilişkili bulunduğu bildirilmiştir. Bu durum, GSTK1 eksikliğinin mitokondriyal bütünlüğü bozabileceğini ve hücreyi oksidatif hasara karşı duyarlı hale getirebileceğini düşündürmektedir. Kanser biyolojisinde de GSTK1'in ilginç bir profili vardır: Sisplatin gibi kemoterapötiklere direnç kazanan bazı tümör hücre hatlarında GSTK1 seviyelerinin arttığı, bazılarında ise azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgu, ilaca direnç mekanizmalarında kompleks bir rol oynayabileceğini göstermektedir. GSTK1, birçok dokuda ifade edilmekle birlikte, özellikle enerji ihtiyacı ve oksidan üretimi yüksek organlarda (karaciğer, böbrek, kalp, kas gibi) belirgin olarak bulunur. İnsan ve kemirgen çalışmalarında kalp, karaciğer, böbrek, akciğer ve testis gibi dokularda GSTK1 protein düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu geniş dağılım, GSTK1'in hücrel detoksifikasyon ve redoks denge sağlanmasında yaygın fakat özel bir rolü olabileceğini göstermektedir (Blackburn ve ark., 2011).

2.11.3. GSTT1: Yapısal ve İşlevsel Özellikler

Glutasyon S-transferaz Theta 1 (GSTT1), GST ailesinin Theta sınıfı üyesidir ve klasik GST özelliklerini taşıyan bir enzimdir. İnsan GSTT1 geni, 22. kromozom üzerinde GSTT2 geni ile komşu halde bulunur ve her iki gen de beş ekzon içerir. GSTT1 ve GSTT2 proteinleri yaklaşık %55 düzeyinde amino asit dizisi benzerliği paylaşır ve işlevsel olarak da birbirine benzeyen enzimlerdir. GSTT1 enzimi, tipik bir sitozolik GST olup homodimer yapı oluşturur. Her monomer, diğer GST sınıflarında olduğu gibi, GSH bağlama bölgesi ve substrat bağlama bölgesine sahiptir. Kristal yapı analizleri, GSTT1-1 dimerinin genel katlanmasının GSTM (Mu) ve GSTA (Alfa) sınıfı GST'lere benzediğini, ancak bazı kilit pozisyonlardaki amino asit farklılıkları nedeniyle substrat tanıma ve katalitik etkinlikte farklılıklar olabileceğini göstermiştir. Nitekim insan GSTT1 enziminin katalitik aktiviteleri incelendiğinde, klasik substratlardan 1,2-epoksi-3-(4-nitrofenoksi) propana karşı güçlü aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Webb ve ark., 1996). GSTT1, özellikle halojenli bileşiklerin GSH ile konjugasyonunda rol oynar. Örneğin, klorlu solvent metabolitleri veya bazı pestisit türevleri GSTT1 tarafından GSH'ye bağlanarak detoksifiye edilir. Bunun yanı sıra, GSTT1 bazı küçük molekülleri aktiveleştirici (biyotransformasyonda toksik

metabolitlere dönüştürücü) bir etki de gösterebilir. Örneğin, diklorometan gibi bileşikler GSTT1 aracılığıyla GSH ile konjüge olup formaldehit gibi reaktif ürünlere ayrışabilmektedir (Chen ve ark., 1996; Katoh ve ark., 1998).

GSTT1 enziminin ilgi çeken bir yönü, insan popülasyonunda yaygın görülen bir genetik varyasyona sahip olmasıdır. GSTT1 null genotipi, bu gende işlevsel delesyon olması anlamına gelir ve pek çok bireyde her iki GSTT1 alelinin de bulunmadığı gözlenmiştir. GSTT1 null bireyler, bu enzime ait aktiviteden yoksundur ancak genellikle sağlıklı görünürler. Bu durum, muhtemelen diğer GST enzimlerinin kısmen telafi edici rolünden kaynaklanır. Ancak epidemiyolojik çalışmalar, GSTT1 null genotipinin belirli çevresel toksinlere maruziyet durumunda kanser riskini etkileyebileceğini ortaya koymuştur (Jaiswal ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2024). Örneğin, bazı araştırmalarda GSTT1 eksikliğinin lösemi ve mesane kanseri riskini artırabileceği öne sürülmüştür. Bunun sebebi, GSTT1'in normalde bu karsinojenleri detoksifiye ediyor olması ve yokluğunda toksik etkinin artmasıdır. İlginç olarak, erkek infertilitesi alanındaki çalışmalar da GSTT1 genotiplerinin sonuçlar üzerindeki etkisini incelemiştir. Bazı raporlara göre, GSTT1 ve GSTM1 genlerinin varyasyonları sperm parametrelerini etkileyebilir. Özellikle, GSTT1 eksikliğinin yüksek ROS düzeylerini dengeleyememesi yoluyla sperm kalitesini düşürebileceği öne sürülmüştür (Jaiswal ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2024). Bunun aksine, bazı popülasyon çalışmalarında GSTT1 null genotipinin infertilite riskini azaltıcı (koruyucu) bir faktör olabileceği gibi beklenmedik bulgular da rapor edilmiştir. Bu çelişkili veriler farklı etnik gruplar, çevresel maruziyetler ve diğer genlerin etkileşimi gibi faktörlere bağlı olabilir (Jaiswal ve ark., 2012).

GSTT1'in doku dağılımı incelendiğinde karaciğer, böbrek ve akciğer gibi detoksifikasyon organlarında anlamlı düzeyde mRNA ve protein ifadesi görüldüğü belirlenmiştir (Knight ve ark., 2007). Ayrıca, insanlarda GSTT1 proteininin eritrositler ve lenfositler gibi kan hücrelerinde de ifade edildiği, hatta bazı lösemi hücre hatlarında yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bu, GSTT1'in ksenobiyotikler kadar endojen metabolik yan ürünlerin de detoksifikasyonunda görev alabileceğine işaret etmektedir (Wang ve ark., 2000). İşlevsel açıdan GSTT1, başta elektrofilik ksenobiyotikleri konjüge ederek hücreyi zararlı kimyasallardan korur. Aynı zamanda endojen olarak

strese bağlı üretilen 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gibi aldehit ürünlerinin GSH ile temizlenmesinde rol alabilir. Her ne kadar Alfa ve Mu sınıfı GST'ler bu tür lipid peroksidasyon ürünlerine daha yüksek afiniteler gösterse de Theta sınıfının da belli katkıları vardır. Sonuç olarak, GSTT1 insan ve deney hayvanlarında antioksidan savunma ve detoksifikasyon ağının önemli bir parçasıdır. Genetik olarak yokluğunun ciddi bir fenotipe yol açmaması, işlevlerinin kısmen diğer GST'lerce telafi edilebilmesine bağlanmaktadır. Yine de GSTT1'in varlığı, özellikle toksik maruziyet koşullarında ve muhtemelen üreme sağlığı gibi özel durumlarda hücreSEL koruma açısından avantaj sağlayabilir (Ferreira ve ark., 2023).

2.12. GST Enzimlerinin Antioksidan Savunmadaki Görevleri

Glutatyon S-transferazlar, oksidatif stres koşullarında hücreyi koruyan çok yönlü savunma mekanizmalarından birini temsil eder. Klasik rolleri olan GSH konjugasyonu sayesinde, ROS etkisiyle oluşan pek çok zararlı yan ürünü detoksifiye edebilirler. Örneğin, lipid peroksidasyon ürünleri olan alfa, beta-enoaldehitler (4-HNE gibi) hücrede birikerek protein ve DNA'ya zarar verebilir. GST'ler, bu elektrofilik aldehitleri GSH ile konjüge ederek daha az reaktif alkollere dönüştürerek enzimatik yollarla metabolize edilmelerini sağlar. Bu bakımdan GST'ler, peroksidatif zararın zincirleme etkisini durdurarak hücre zarlarının ve makromoleküllerin korunmasına katkıda bulunur. Ayrıca, bazı GST izozimleri (özellikle Alfa sınıfı) selenyum bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi sergileyerek organik hidroperoksitleri (örn. yağ asidi hidroperoksitleri veya kolesterol ester hidroperoksitleri) GSH yardımıyla su ve alkole indirgeyebilir. Bu reaksiyon, klasik GPx enzimlerinden bağımsız ek bir koruyucu yol sağlar. Her ne kadar bu aktivite insanlarda çoğunlukla Alfa sınıfı GST'ler tarafından gerçekleştiriliyor olsa da tüm GST'ler, hücrede GSH düzeyini ve dağılımını etkileyerek antioksidan savunmaya dolaylı katkılar sunar (Yang ve ark., 2001).

GST'ler, antioksidan savunmada hem enzimatik aktiviteye hem de düzenleyici işlevlere sahiptirler. Bazı çalışmalar, GST'lerin hücre sinyal yollarıyla etkileştiğini ve örneğin kinazları veya transkripsiyon faktörlerini bağlayarak oksidatif stres yanıtlarını modüle ettiğini göstermektedir. Örneğin, GSTP1 izoenziminin JNK (c-Jun N-terminal kinaz) yolunu düzenlediği, aşırı ROS etkisi altında GSTP1'in JNK'yı bağlayarak

inaktif tuttuğu, ancak GSH eksikliği veya aşırı ROS bulunması halinde bu kompleksin dağılarak JNK'nın apoptoz sinyalini başlattığı gösterilmiştir. Bu da GST'lerin bir çeşit sensör ve düzenleyici gibi davranabileceğine işaret eder (Yang ve ark., 2001). Özellikle GSTK1 ve GSTT1 gibi spesifik izoenzimler, antioksidan savunmada belirli roller oynar. GSTK1'in mitokondri ve peroksizomlarda yer alması, onu bu organellerde oluşan ROS'a karşı ilk savunma hattı haline getirir. Mitokondriyal elektron taşıma sırasında oluşan süperoksit ve peroksizomal yağ asidi oksidasyonu sırasında oluşan H_2O_2 , GSTK1 tarafından üretilen GSH konjugatları sayesinde dolaylı olarak temizlenebilir veya daha aşağı toksisite düzeyine indirilebilir. GSTK1 eksikliğinde mitokondriyal işlev bozukluğu ve kronik inflamasyon belirleçlerinin artışı, bu enzimin normalde mitokondriyi oksidatif hasardan koruduğunu göstermektedir. GSTT1 ise, daha yaygın detoksifikasyon faaliyetlerinin parçası olmakla birlikte, hücresel oksidan birikimini sınırlandırmaya yardımcı olur. Konjugasyon olmaması durumunda özellikle glutatyonla konjuge olan ara ürünlerin bir kısmı, serbest radikal veya güçlü elektrofil olarak hücreye zarar verebilir. Örneğin, tiyoeter konjugasyonları sayesinde klorlanmış organiklerin reaktif türevleri uzaklaştırılır, arsenik metabolitlerinin atılımı kolaylaşır ve endojen tiyol modifikasyonlarına yol açabilecek bileşikler detoksifiye edilir. Bunların sonucunda, hücre içinde ROS kaynaklı zincir reaksiyonlar kontrol altında tutulur. Nitekim *in vitro* sperm modeli çalışmalarında GST aktivitesinin azalmasına bağlı ROS düzeylerindeki artışın lipid peroksidasyonunu ve DNA parçalanmasını artırdığı bildirilmiştir (Jaiswal ve ark., 2012).

Epididimis gibi organlarda GST'lerin salgılanarak veya hücre yüzeyinde lokalize olarak lokal antioksidan koruma sağladığı düşünülmektedir. Epididimal sıvının yüksek GSH içerdiği ve çeşitli antioksidan enzimlerce desteklendiği ve bu sayede olgunlaşan spermleri zararlı oksijen türlerinden korunduğu bilinmektedir (Llavanera ve ark., 2019). Sperm yüzeyinde tespit edilen GST enzimlerinin, sperm plazma membranını çevreleyen mikro çevredeki oksidanları nötralize ederek spermlerin epididimide hayatta kalma süresini uzattığı öne sürülmüştür. Bir çalışmada sperm plazma membranında lokalize GST Mu sınıfı bir alt birimin (GSTM3) dondurma-çözme sırasında artan ROS'a karşı koruyucu rol oynadığı ve

içerik düzeyinin sperm kalitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, sperm yüzeyindeki GST'lerin olası bir işlevi, epididimal depolama esnasında oksidatif strese karşı koruma sağlamak şeklinde tanımlanmıştır (Llavanera ve ark., 2019). Bu bulgular, GST ailesinin hem hücre içinde hem hücreler arası ortamlarda oksidan kontrolüne katkıda bulunduğunu göstermektedir.

2.13. Erkek Üreme Sisteminde ROS Oluşumu ve GSTK1/GSTT1'in Roller

Erkek üreme sistemi özellikle de spermatogenez ve sperm matürasyonu süreçleri, son derece hassas bir oksidan/antioksidan dengeye gereksinim duymaktadır. Spermilerin sağlıklı gelişimi ve işlevi için hem ROS hem de antioksidan sistemlerin uygun düzeylerde bulunması gerekmektedir. Düşük düzeylerde ROS, testis içinde hücrel sinyalleşmenin bir parçası olup spermatogenez ve steroidogenez gibi süreçlerde düzenleyici roller oynar (Gram ve ark., 2022). Örneğin fizyolojik miktarlarda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit, gelişen germ hücrelerinin farklılaşma yollarını etkileyebilir. Ancak ROS üretimi kontrolden çıktığında oksidatif stres başlar ve bu durum üreme hücrelerine ciddi zararlar verir. Bu nedenle, testis ve epididimis gibi ortamlarda güçlü antioksidan savunma sistemleri bulunur. Nitekim testiste bulunan enzimatik antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidazlar (GPx), glutatyon-S-transferazlar (GST) ve glutatyon redüktaz gibi enzimleri barındırır (Gram ve ark., 2022). Sertoli ve Leydig hücreleri, yüksek glutatyon (GSH) düzeyleri ve SOD, katalaz, GPx gibi enzimlerle seminifer tübüllerde oksidanları etkisiz hale getirerek germ hücrelerini korurlar. Çalışmalar, infertil erkeklerde oksidatif stres belirteçlerinin fertil erkeklere göre daha yüksek, toplam antioksidan kapasitelerinin ise daha düşük olduğunu ve oksidatif dengenin bozulmasının klinik olarak sperm kalitesini düşürdüğünü ortaya koymaktadır (Ayad ve ark., 2022).

2.13.1. Testis ve Spermatogenezde Oksidatif Denge

Testis, spermatogonyumlardan olgun spermatozoalara kadar uzanan spermatogenez sürecinin gerçekleştiği organdır. Bu süreç boyunca hücrelerde yoğun enerji harcaması ve hızlı bölünmeler olur. Normal koşullarda testiste ROS üretimi,

hücre sinyal mekanizmalarının bir parçası olarak kontrollü düzeydedir ve spermatogenezin düzenlenmesine katkı sağlar. Örneğin, ROS'un fizyolojik miktarları hücre döngüsüyle ilgili bazı yolları uyararak spermatogenezde gerekli adımların gerçekleşmesine yardım eder. Ancak yüksek düzeyde ROS birikimi son derece zararlıdır. Oksidatif stres oluştuğunda germ hücrelerinde apoptoz, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA/RNA hasarı gözlenir (Şekil 2.2). Nitekim aşırı ROS, spermatosit ve spermatidlerde DNA parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açarak spermatogenez sekteye uğratabilir. Bu nedenle testis ortamında ROS seviyeleri sıkı kontrol edilmelidir (Barati ve ark., 2020; Gram ve ark., 2022).

Şekil 2.2. Erkek üreme sisteminde ROS'un fizyolojik ve patolojik rolleri (Barati ve ark., 2020).

oluşabilecek ROS'u detoksifiye eden enzim sistemlerine sahiptir. Normal bir testiste antioksidan savunma mekanizmaları, ROS'un patolojik düzeylere ulaşmasını engelleyerek bunların fizyolojik sinyal düzeylerinde kalmasını sağlar. Ancak ROS'un aşırı üretimi, testisteki oksidatif dengeyi bozabilir. Nitekim kriptorşidizm, varikosel, enfeksiyonlar veya toksik ajanlara maruziyet gibi durumlar, testiste ROS oluşumunu belirgin şekilde artırmaktadır. Bu koşullar altında oksidatif stres düzeylerinin yükselmesi, spermatogenez sürecini ciddi biçimde olumsuz etkileyerek yapısal ve işlevsel bozukluklara yol açabilir. Yüksek ROS seviyeleri, spermatogenik hücrelerde DNA hasarı ve hücre ölümüne yol açarak sperm üretimini azaltır. Çünkü varikosel, enfeksiyon gibi infertiliteyle ilişkili durumlarda sıklıkla oksidatif stres artışı saptanmıştır (Kaltsas, 2023). Genç ve sağlıklı bir erkekte bile testis, aşırı ısıya veya radyasyona maruz kalırsa kısa sürede sperm parametrelerinde düşüş gözlemlenebilir. Bunun temel nedeni, artan ROS'nin sperm üretimine zarar vermesidir. Bu nedenle, *in vivo* antioksidan mekanizmaların güçlü olması, testis işlevi için hayati önem taşımaktadır. Testiste GST enzimlerinin bulunması, bu noktada önem kazanır. Özellikle mitokondride yer alan GSTK1, testiste enerji ihtiyacı yüksek germ hücrelerinde (örneğin spermatidler) oluşan ROS'nin lokal olarak temizlenmesine yardımcı olabilir. Çünkü sıçanlarda gebelik sırasında arseniğe maruz kalınmasının, ergenlik dönemindeki erkek yavruların testisinde antioksidan gen ifadelerini değiştirdiği ve özellikle SOD1, SOD2, katalaz ve GSTK1 genlerinde belirgin farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Bu adaptif yanıt, GSTK1'in oksidatif strese karşı testiste rol alabileceğini düşündürmektedir. İnsan testisinde de GSTK1 proteininin ifade edildiği bilinmektedir. İmmünohistokimyasal incelemeler, spermatogoniumlardan spermatidlere kadar germ hücrelerinde GSTK1 ifadesini ortaya çıkarmıştır. Bu bulgular, GSTK1'in spermatogenez boyunca hücreleri oksidatif hasardan korumaya katkı sağladığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, GSTT1 enzimi de testiste hem germ hücrelerinde hem de somatik hücrelerde bulunabilir. Bazı çalışmalarda GSTT1 mRNA'sının testis dokusunda ifade edildiği gösterilmiştir (Gram ve ark., 2022; Okubo ve ark., 2005; Ichioka ve ark., 2009). Testiste GSTT1'in olası rolü, spermatogenez sırasında oluşan toksik yan ürünleri detoksifiye etmek olabilir. Örneğin, spermilerin farklılaşması sürecinde açığa çıkan elektrofilik ara ürünler veya çevresel ksenobiyotikler, GSTT1 tarafından GSH ile konjüge edilerek zararsız hale

getirilebilir. GSTT1 geninin eksik olduğu (null) bireylerde spermatogenezin nasıl etkilendiğine dair kesin veriler olmamakla birlikte, bazı popülasyon çalışmalarında GSTT1 yokluğunun erkek infertilitesi riskini etkileyebileceğine (artırabileceğine) dair bulgular vardır. Bu durum, GSTT1'in testiste işlevsel öneme sahip olabileceğini ortaya koymaktadır. Örneğin, varikozel hastalarında yapılan bir çalışmada, GSTT1 ve GSTM1 genotipi pozitif (yani bu genleri taşıyan) olan erkeklerin varikosektomi ameliyatı sonrasında sperm motilitesinde, bu enzimleri taşımayanlara kıyasla daha belirgin iyileşme gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuç, varikozel gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda GSTT1'in spermeleri koruyucu etki sağlayabileceğini düşündürmektedir (Okubo ve ark., 2005).

2.13.2. Epididimis ve Sperm Matürasyonunun Mikroçevresi

Epididimis, testiste üretilen spermatozoonların morfolojik ve işlevsel olarak olgunlaştığı, aynı zamanda ejakülasyona kadar depolandığı kıvrımlı bir kanaldan oluşan, erkek genital sisteminin tübüler yapılarından biridir. Anatomik olarak başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda olmak üzere dört ana bölümden oluşan epididimis, sperm hücrelerinin testisten çıktıktan sonraki yaklaşık iki ila üç hafta süren transit sürecinde ardışık biyokimyasal ve biyofiziksel değişimlere maruz kaldığı, özgün mikroortam sunmaktadır. Her bir segment, sperm matürasyonunun belirli aşamalarını destekleyecek şekilde farklı yapısal ve moleküler özelliklere sahiptir (Chabory ve ark., 2009; O'Flaherty, 2019). Epididimis epitel hücreleri, sperm hücrelerinin artık kendilerinin sentezleyemediği koruyucu proteinleri ve enzimleri salgılar. Özellikle glutatyon peroksidaz 5 (GPx5) enzimi, memelilerde sadece epididimal sıvıda bulunan selenyum içermeyen bir glutatyon peroksidazdır ve spermelerin plazma membranındaki lipid hidroperoksitlerini indirger. Bu sayede sperm DNA bütünlüğünü korur ve dölleme kapasitelerinin sürmesine yardımcı olur. GPx5'in önemini gösteren bir çalışmada, Gpx5-geni nakavt edilen (GPx5^{-/-}) farelerin epididimlerinde depolanan spermelerde zamanla DNA hasarının biriktiği ve ileri yaşlarda bu erkeklerin eşlerinde gebelik kayıplarının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, epididimal antioksidan savunmanın sağlıklı sperm ve embriyo gelişimi için kritik olduğunu kanıtlamaktadır (Chabory ve ark., 2009).

Epididimisin enzimatik antioksidan sistemi SOD, katalaz, peroksiredoksin (PRDX), tioredoksin gibi çeşitli enzimleri içerdiği gibi GST ailesi üyelerini de barındırır. Epididimisin antioksidan savunma sisteminde glutatyon-S-transferazların bulunduğu ve tüm bu enzimlerin ortaklaşa çalışarak epididimal matürasyon süresince ROS seviyelerini düşük tuttukları vurgulanmıştır (Chabory ve ark., 2009). Nitekim immunohistokimyasal çalışmalar, sıçan epididimisinde Mu sınıfına ait Yb1 alt birimi gibi bazı GST'lerin bölgesel özgünlük gösterdiğini ve epididimal lümen sıvısında da bulunabildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, epididimal epitelinin bazı GST enzimlerini lümene salgılayarak sperm yüzeyine bağlanmalarını sağladığı görüşünü ortaya atmaktadır. Böylece spermatozoalar, epididimis lümeninde beklerken, çevrelerindeki sıvı ortam ROS'a karşı tamponlanmış olur (Chabory ve ark., 2009).

Sperm matürasyonu süreci, fizyolojik olarak kontrollü düzeyde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretildiği ve bu türlerin sinyal iletimi mekanizmalarında düzenleyici roller üstlendiği kompleks bir biyokimyasal aşamadır. Epididimis kanalının proksimal bölgesi olan kaput segmentinde, henüz tam işlevsel olgunluğa erişmemiş spermatozoonların plazma membranı kompozisyonu ve yüzey proteinlerinde önemli yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu süreç esnasında düşük konsantrasyonlardaki ROS, özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2), sperm hücresinin ilerleyici motilite kapasitesini kazanması ve kapasitasyon olarak tanımlanan olgunlaşma sürecinin başlatılması açısından sinyal molekülü niteliği taşır (Wang ve ark., 2025). Literatürde NADPH oksidaz 5 (NOX5) enziminin kapasitasyon sürecinde aktive olduğu, spermatozoonlar tarafından süperoksit üretiminin artırıldığı ve bu artışın hücre içi cAMP düzeyleri ile protein tirozin-fosforilasyonlarını modüle ederek hiperaktivasyon ile karakterize edilen güçlü kuyruk hareketlerinin ve akrozomal reaksiyona hazırlığın tetiklenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak epididimisin distal segmenti olan kauda bölgesine ulaşıldığında spermatozoonlar, artık depolama fazına geçer ve metabolik aktiviteleri minimum seviyeye indirgenir. Bu dönemde ROS üretimi baskılanır ve epididimal sıvının antioksidan kapasitesi maksimum düzeye ulaşır. Kauda epididimis sekresyonlarının, başta indirgenmiş glutatyon (GSH) olmak üzere çeşitli non-enzimatik antioksidan moleküller ve enzimatik savunma proteinleri açısından zengin olduğu gösterilmiştir. Bu zengin antioksidan ortam, sperm

hücrelerini depolama süresince oksidatif hasara karşı koruyarak hücresel bütünlüklerinin ve fertilizasyon yeteneklerinin korunmasına katkı sağlar. Dolayısıyla epididimal redoks mikroçevresi, sperm gelişiminin erken dönemlerinde ROS aracılı fizyolojik olgunlaşma süreçlerini desteklerken, geç dönemlerde bu oksidanların zararlı etkilerini sınırlayacak şekilde yeniden düzenlenir. Bu çift yönlü denge, sperm işlevlerinin optimal düzeyde sürdürülmesinde temel bir fizyolojik mekanizma olarak kabul edilmektedir (Agarwal ve ark., 2019; Barati ve ark., 2020; Lee ve ark., 2017; Wang ve ark., 2025).

Domuz spermalarında GSTK1 proteininin bol miktarda bulunduğu, kapasitasyon sonrası akrozom bölgesinde yoğunlaştığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, hareketliliği düşük (motilitesi zayıf) spermelerde GSTK1 seviyesinin anlamlı ölçüde azaldığı ve GSTK1'in genel olarak sperm kalitesiyle pozitif ilişki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca kapasitasyon sonrası spermelerin anti-GSTK1 antikoru ile inkübe edilmesinin, *in vitro* fertilizasyonda başarı oranını düşürdüğü bulunmuştur. Bu bulgular, epididimide spermelerin kazandığı GSTK1 proteininin fertilizasyon yeteneği için önemli olabileceğini düşündürmektedir. Muhtemelen GSTK1, sperm akrozomunda konumlanarak akrozomal reaksiyon sırasında veya sperm-oosit etkileşimi esnasında lokal oksidatif ortamın düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Zeng ve ark., 2022).

GSTT1'e dair epididimis veya sperm özgül çalışmalar daha sınırlı olsa da epididimal GST sisteminin genel olarak sperm koruması için gerekli olduğu açıktır. GSTT1, epididimideki diğer GST izoenzimleri (ör. Mu ve Pi sınıfları) ile birlikte çalışarak lümendeki potansiyel toksik metabolitlerin temizlenmesine yardım edebilir. Ayrıca bazı bulgular, GSTT1 varlığının sperm parametreleriyle ilişkili olabileceğini ima etmektedir. Örneğin, oksidatif stresin yüksek olduğu varikosel durumunda antioksidan takviyelerin semen parametrelerini iyileştirdiği ve ROS seviyelerini düşürdüğü bilinmektedir. Bu iyileşmede endojen GST sisteminin desteklenmesinin payı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü GSTT1 pozitif genotipe sahip varikoselli hastaların ameliyat sonrası sperm motilite artışı, GSTT1 olmayanlara kıyasla daha fazla olmuştur (Marks ve ark., 1986; Ichioka ve ark., 2009). Genel olarak değerlendirildiğinde GST ailesi üyelerinin rat testis ve epididimisteki ifade ve işlevine

yönelik çalışmaların oldukça sınırlı olması (Papp ve ark., 1995; Veri ve ark., 1994) ve farklı postnatal gelişim dönemlerine ait çalışmaların bulunmaması, bu çalışmanın önemini artırmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada farklı postnatal gelişim dönemlerindeki sıçan testis ve epididimis segmentlerinde GSTK1 ve GSTT1 ifadesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, erkek üreme sisteminde testis ve epididimis dokularındaki glutatyon-S-transferaz Kappa 1 (GSTK1) ve glutatyon-S-transferaz Theta 1 (GSTT1) izoenzimlerinin gelişimsel süreç boyunca hücresel dağılımını değerlendirmek amacıyla toplam 24 adet sağlıklı erkek Wistar albino sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanılacaktır. Hayvanlar, testiküler ve epididimal gelişimin postnatal dönemlerini temsil edecek şekilde dört farklı yaş grubuna ayrılacaktır. Postnatal 5. gün (PND 5) neonatal dönemi, postnatal 20. gün (PND 20) infantil dönemi, postnatal 50. gün (PND 50) peripubertal dönemi ve postnatal 70. gün (PND 70) geç ergenlik dönemini temsil edecek biçimde sınıflandırılacaktır. Her bir yaş grubunda altı birey bulunacak şekilde (n = 6) deneysel planlama yapılacaktır. Bu zaman noktaları, sıçan erkek üreme sisteminin histolojik ve işlevsel olgunlaşmasının farklı evrelerini yansıtmakta olup, GSTK1 ve GSTT1 ifadelerinin gelişimsel süreç içerisindeki değişimini değerlendirmek açısından biyolojik olarak anlamlı bir çerçeve sunmaktadır. Çalışmada elde edilecek bulgularla, testiküler ve epididimal dokularda bu enzimlerin bölgesel dağılım özellikleri ve olası koruyucu işlevleri detaylı şekilde ortaya konulacaktır. Böylece, erkek üreme sisteminde antioksidatif savunmanın önemli bileşenlerinden biri olan GST ailesine ait bu iki izoformun fizyolojik gelişim sürecindeki katkıları, ilk kez karşılaştırmalı ve dönemsel olarak incelenmiş olacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Düzenegi ve Etik Kurul İzni

Bu çalışmada Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen toplam 24 adet sağlıklı erkek Wistar albino sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanıldı. Hayvanlar, testiküler ve epididimal gelişimin postnatal dönemlerini temsil edecek şekilde dört farklı yaş grubuna ayrıldı. Gruplar postnatal 5. gün (PND 5) neonatal dönemi, postnatal 20. gün (PND 20) infantil dönemi, postnatal 50. gün (PND 50) peripubertal dönemi ve postnatal 70. gün (PND 70) geç ergenlik dönemini temsil edecek şekilde sınıflandırıldı. Her yaş grubunda altışar hayvan yer aldı (n = 6). Deneysel uygulamalar, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 14.02.2024 tarihli ve 1270 sayılı kararıyla onaylandı.

3.2. İmmünohistokimyasal Analiz

Hayvanlar, uygun anestezi altında sakrifiye edildikten sonra her hayvandan testis ve epididimis dokuları dikkatlice diseke edildi. Epididimis dokuları, anatomik farklılıklar dikkate alınarak başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda olmak üzere dört segmente ayrıldı ve her biri ayrı ayrı değerlendirildi. Elde edilen doku örnekleri, Bouin solüsyonu ile oda sıcaklığında 12 saat süreyle fiks edildi. Fiksasyonu takiben dokular, sırasıyla %70, %80, %96 ve %100 etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş, ardından benzol ve metilbenzoat ile saydamlaştırıldı ve parafin infiltrasyonuna alınarak parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığında seri kesitler, APES (3-aminopropiltriethoksisilan) kaplı lamlara yerleştirildi. Lamlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra immünohistokimyasal boyama aşamasına geçildi. Testis ve epididimis segmentlerinde GSTK1 ve GSTT1 proteinlerinin doku düzeyindeki dağılım ve ifade yoğunluğunu belirlemek amacıyla streptavidin-biyotin-peroksidaz temelli indirekt immünohistokimyasal yöntem uygulandı. Boyama sürecinde Abcam firmasına ait Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit (ab93677) kullanıldı. Lamlar,

deparafinizasyon amacıyla 60°C'de 1 saat etüvde bekletildi, ardından iki kez 10'ar dakika süreyle ksilende tutuldu. Rehidrasyon işlemi için %100'den %70'e azalan dereceli etanol serilerinden geçirilen kesitler, fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu amacıyla %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ile 10 dakika inkübasyon yapıldı. Bunu takiben, kit içeriğinde bulunan blokaj serumu ile özgül olmayan antikor bağlanmalarını engellemek amacıyla oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon uygulandı. Primer antikor uygulamasında Proteintech firmasına ait GSTK1 (Cat. No: 14535-1-AP) ve GSTT1 (Cat. No: 15838-1-AP) primer antikorları kullanıldı. Antikorlar üretici önerileri doğrultusunda 1:300 oranında, Thermo Scientific Antibody Diluent (Cat. No: TA-125-ADQ) kullanılarak seyreltilti. Hazırlanan primer antikor solüsyonları lamlar üzerine damlatıldı ve +4 °C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda lamlar PBS ile üç kez beşer dakika yıkandı. Ardından, biyotin konjugatlı sekonder antikor ve streptavidin-peroksidaz konjugatı sırasıyla uygulandı ve her biri oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Enzim substratı olarak AEC (3-Amino-9-etilkarbazol) çözeltisi kullanıldı. Renk gelişimi sırasında kırmızımsı kahverengi çökelti oluşumu mikroskop altında gözlemlendi ve reaksiyon süresi 5–10 dakika aralığında kontrol edildi. Reaksiyon distile su ile durduruldu. Kesitler, Gill hematoksilen ile kısa süreli karşı boyamaya tabi tutuldu ve mavi renk oluşuncaya kadar musluk suyu altında yıkandı. Hazır duruma gelen preparatlar, alkol ve ksilen serilerinden geçirilmeden doğrudan su bazlı montaj ortamı ile kapatıldı.

Boyama özgüllüğünü değerlendirebilmek amacıyla her boyama setinde kontrol grupları oluşturuldu. Negatif kontrol grubunda primer antikor yerine PBS uygulandı. Pozitif kontrol olarak ise glutatyon S-transferazların yoğun olarak ifade edildiği bilinen sıçan böbrek dokusu kullanıldı. Boyanan kesitler, Olympus BX51 ışık mikroskobu ile incelendi, mikroskopa entegre DP72 dijital kamera sistemi aracılığıyla görüntülendi ve dijital olarak kaydedildi.

3.3. İmmunohistokimyasal Boyamaların Semikantitatif analiz

Testis ve epididimis dokularında GSTK1 ve GSTT1 proteinlerinin ifade düzeyleri, immünohistokimyasal olarak boyanmış kesitlerde gerçekleştirilen

semikantitatif analiz yöntemiyle değerlendirildi. Her bir hayvana ait üçer ardışık doku kesitinde, rastgele seçilen beş farklı mikroskopik alanda yapılan gözlemler esas alınarak germ hücreleri, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, peritübüler hücreler ve epididimis epitel hücreleri ayrı ayrı analiz edildi. İmmünboyanmanın hücre içi lokalizasyonu (sitoplazmik, nükleer veya membranöz), dağılım örüntüsü (fokal ya da diffüz) ve yoğunluğu dikkate alındı. İfade düzeyleri, hücre tipi ve anatomik lokalizasyona göre aşağıdaki şekilde derecelendirildi: boyanma yok (-), çok zayıf (-/+), zayıf (+), zayıf-orta (+/+), orta (++), orta-güçlü (++/+), güçlü (+++). Bu değerlendirme yaklaşımı, daha önce vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörlerinin sıçan testis ve epididimis dokularında postnatal gelişim süresince gösterdiği spatiotemporal ifade örüntülerini analiz etmek amacıyla kullanılan yöntem esas alınarak yapılandırıldı (Özbek ve ark., 2025).

3.4. Kantitatif İmmünohistokimyasal Görüntü Analizi

GSTT1 ve GSTK1 immünifadesine yönelik immünohistokimyasal boyanma düzeyleri, testis ve epididimis dokularına ait kantitatif görüntü analizleri ile değerlendirildi. Her gruptaki altı hayvandan, ilgili her bir bölgeye ait iki temsili görüntü alınarak toplamda her grup için 12 görüntü analiz edildi. Görüntüler, aynı büyütmede (40x) ve sabit pozlama koşullarında Olympus BX51 mikroskop ve dijital kamera sistemiyle elde edildi. Analiz işlemleri, ImageJ (NIH, USA) yazılımı ile gerçekleştirildi. İmmünopozitif sinyallerin ayrıştırılması için Color Deconvolution eklentisi (H-AEC vektörü) kullanıldı. AEC substratına ait immünopozitif alanlar, toplam doku alanına oranlanarak pozitif boyanma yüzdesi hesaplandı. Değerlendirme sırasında yalnızca hedef hücre popülasyonlarını temsil eden doku alanları kullanıldı. Bağ dokusu, damar boşlukları ve teknik artefakt içeren alanlar analiz kapsamına alınmadı. Tüm görüntüler, iki bağımsız gözlemci tarafından çift körleme yöntemiyle incelendi ve ortalama değerler üzerinden değerlendirme yapıldı (Özbek ve ark., 2025).

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen boyanma yüzdesi verileri, GraphPad Prism 9.0 yazılımı kullanılarak analiz edildi. PND5, PND20, PND50 ve PND70 dönemlerine ait gruplar

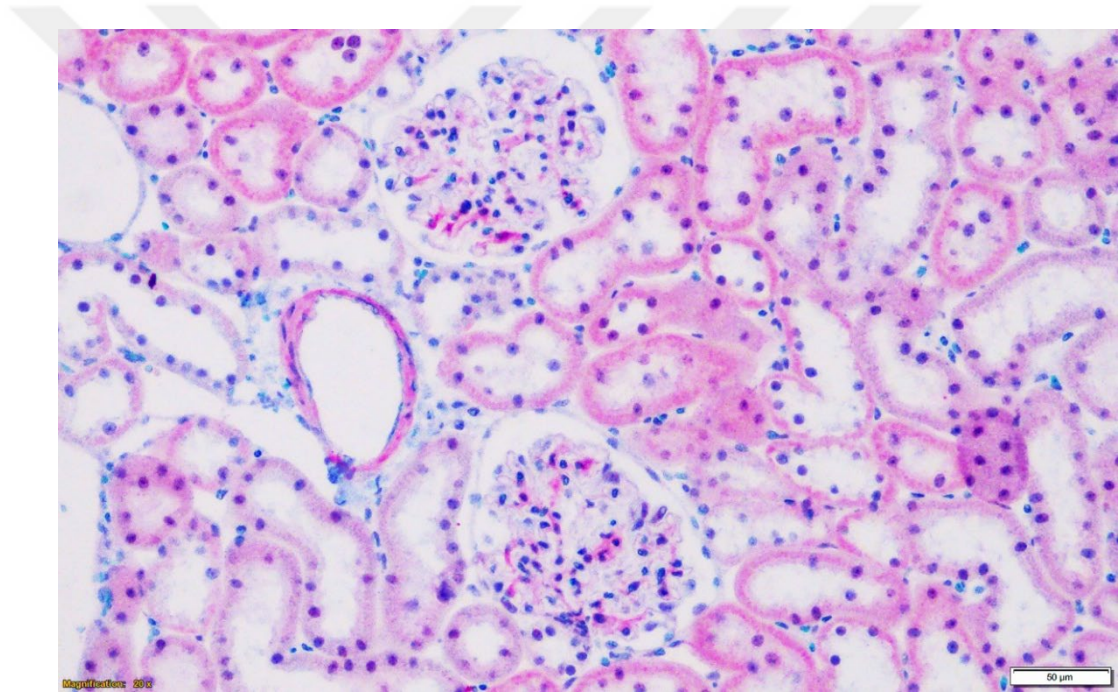
arasında anlamlı fark olup olmadığını belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) uygulandı. Anlamlı farklılık saptanan gruplar arasında karşılaştırma yapmak için Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tüm sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata (mean $\pm$ SEM) olarak ifade edildi ve anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.



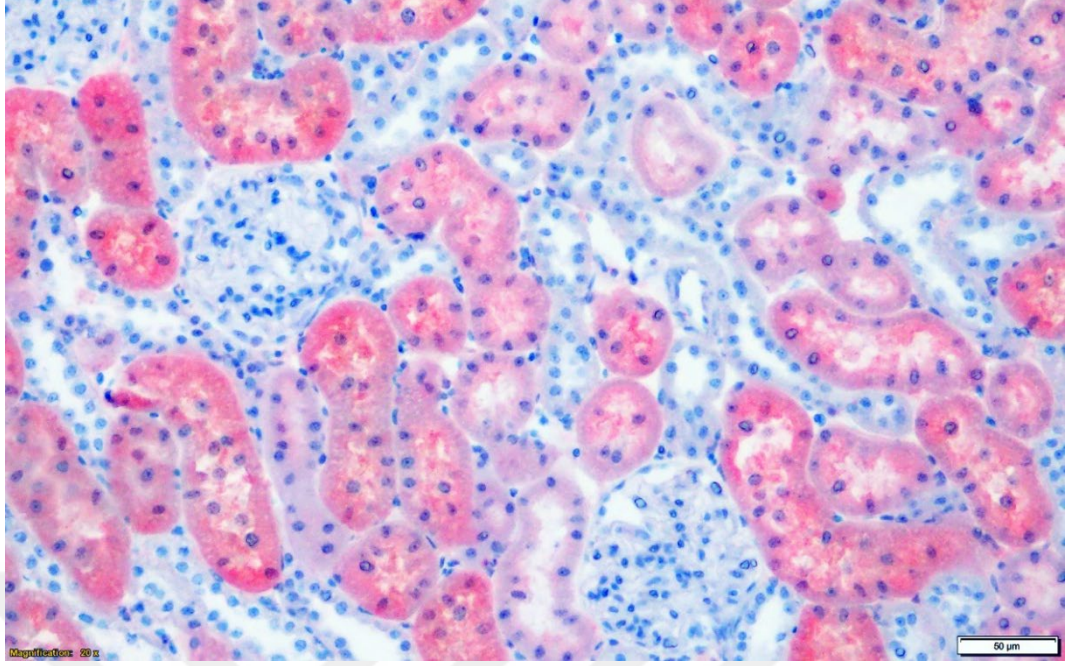
4. BULGULAR

4.1. Pozitif ve Negatif Kontrol Değerlendirmesi

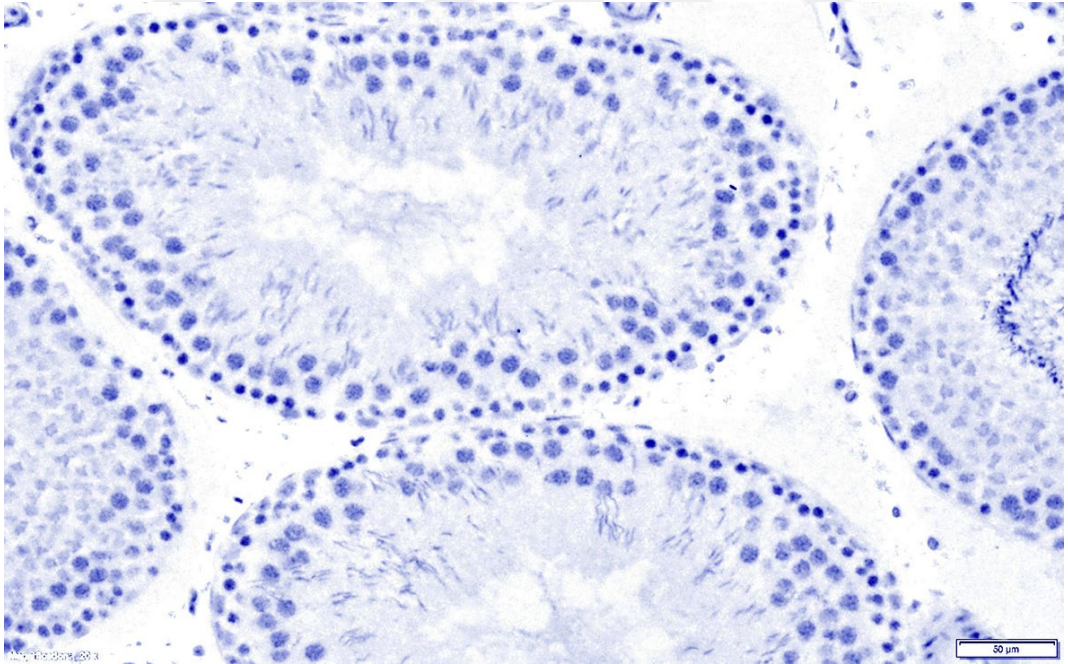
GSTK1 pozitif kontrolünde proksimal kıvrımlı tübül epiteli, distal kıvrımlı tübül epiteli ve glomerüler alanlarda immün boyanması gözlemlendi (Şekil 4.1). GSTT1 pozitif kontrolünde distal kıvrımlı ve toplayıcı kanal tübül epitel hücrelerinde oldukça zayıf sitoplazmik immün boyanma gözlenirken proksimal kıvrımlı tübül epitel hücrelerinde yoğun immün boyanma gözlemlendi (Şekil 4.2). Negatif kontrol boyamasında ise herhangi bir reaksiyon gözlenmedi (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. GSTK1 pozitif kontrol. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



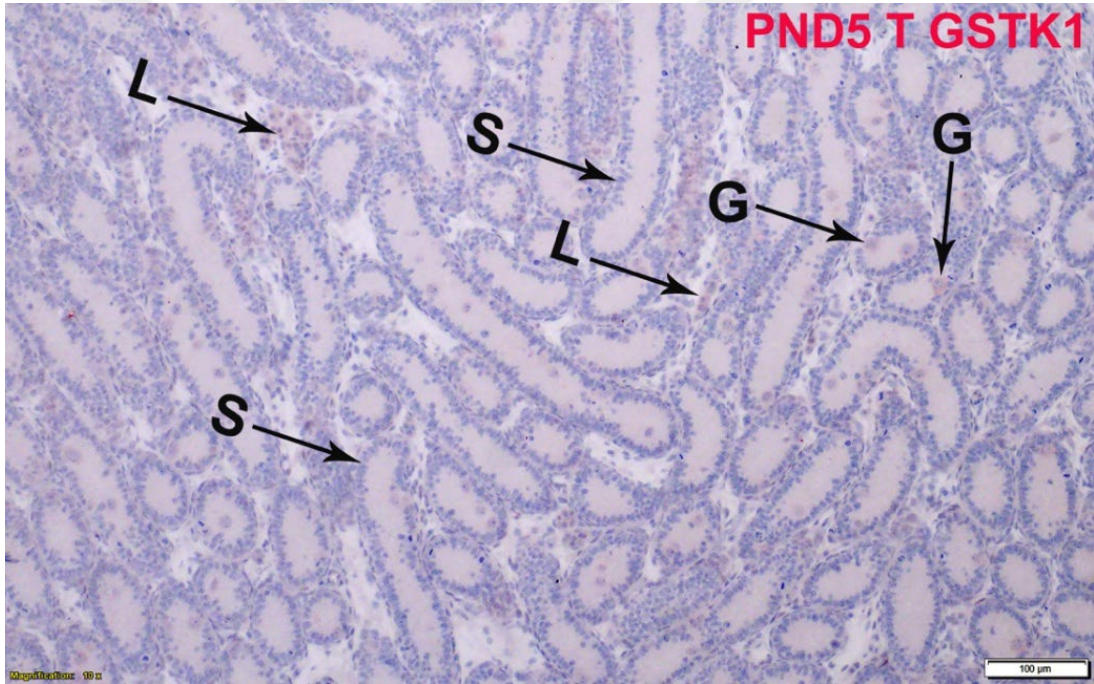
Şekil 4.2. GSTT1 pozitif kontrol. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



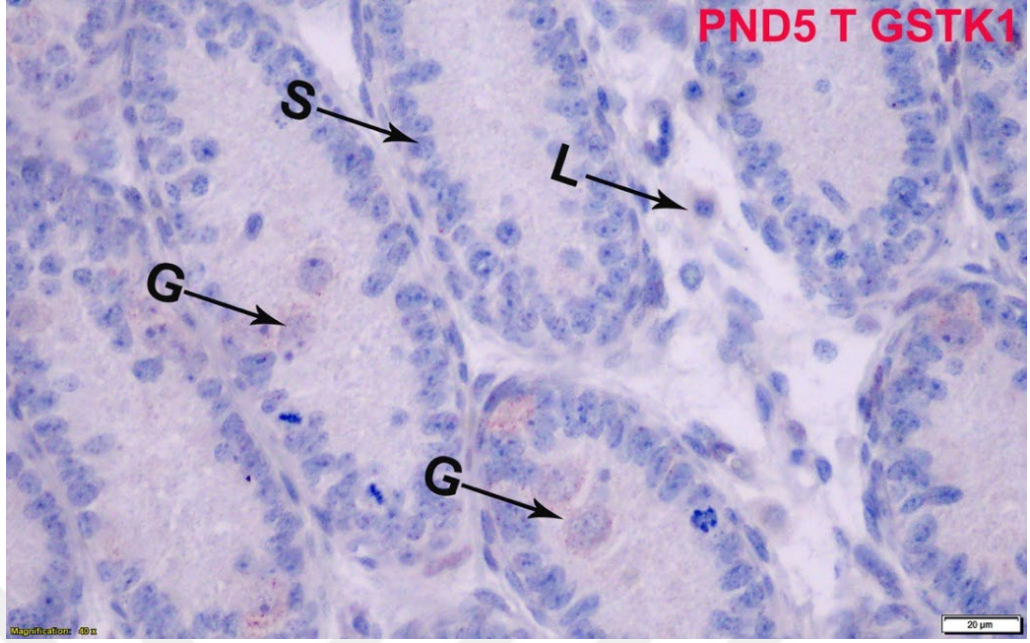
Şekil 4.3. Negatif kontrol. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

4.2. Postnatal 5. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi

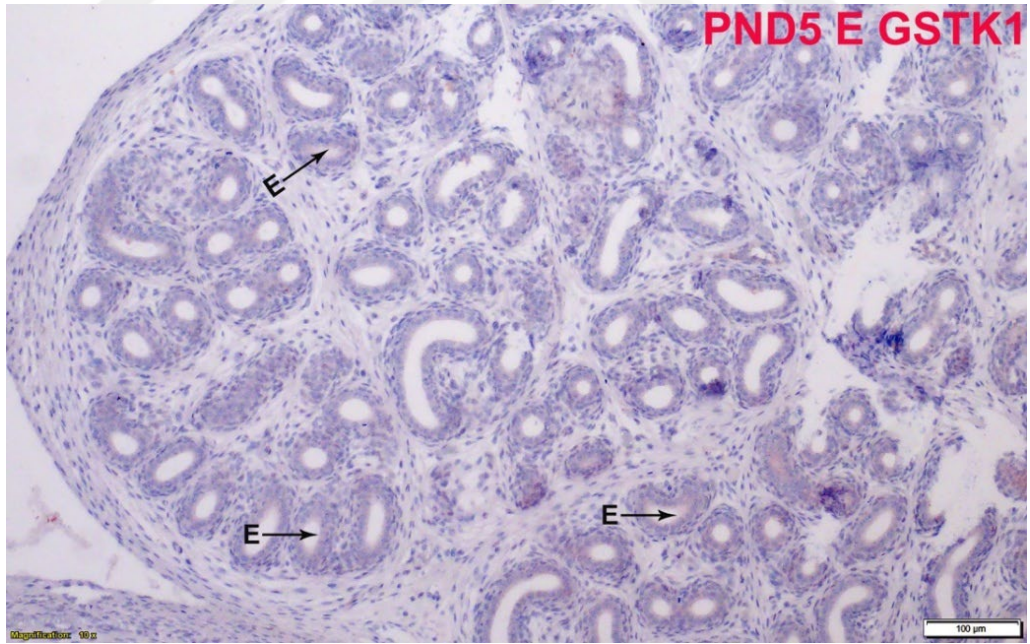
Postnatal 5. gün testis dokusuna ait immünohistokimyasal incelemelerde GSTK1 proteininin ifadesi son derece sınırlı düzeyde bulundu. Bu dönemde seminifer epitel, yalnızca gonositler ve sertoli hücrelerinden oluşmakta olup, germ hücre hattının ileri farklılaşma evrelerine ait hücreler henüz histolojik olarak belirgin değildi. GSTK1 pozitifliği özellikle gonositlerde çok zayıf düzeyde izlendi (-/+). Bu hücrelerin sitoplazmasında düzensiz, silik nitelikte immünreaktivite dikkati çekti. Sertoli hücrelerinde GSTK1 ifadesine dair herhangi bir bulguya rastlanmadı (-)(Şekil 4.4-4.5). Epididimis dokusuna ilişkin değerlendirmelerde başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgelerinin tamamında epitel hücrelerinde çok zayıf düzeyde (-/+) GSTK1 pozitifliği gözlemlendi (Şekil 4.6-4.7).



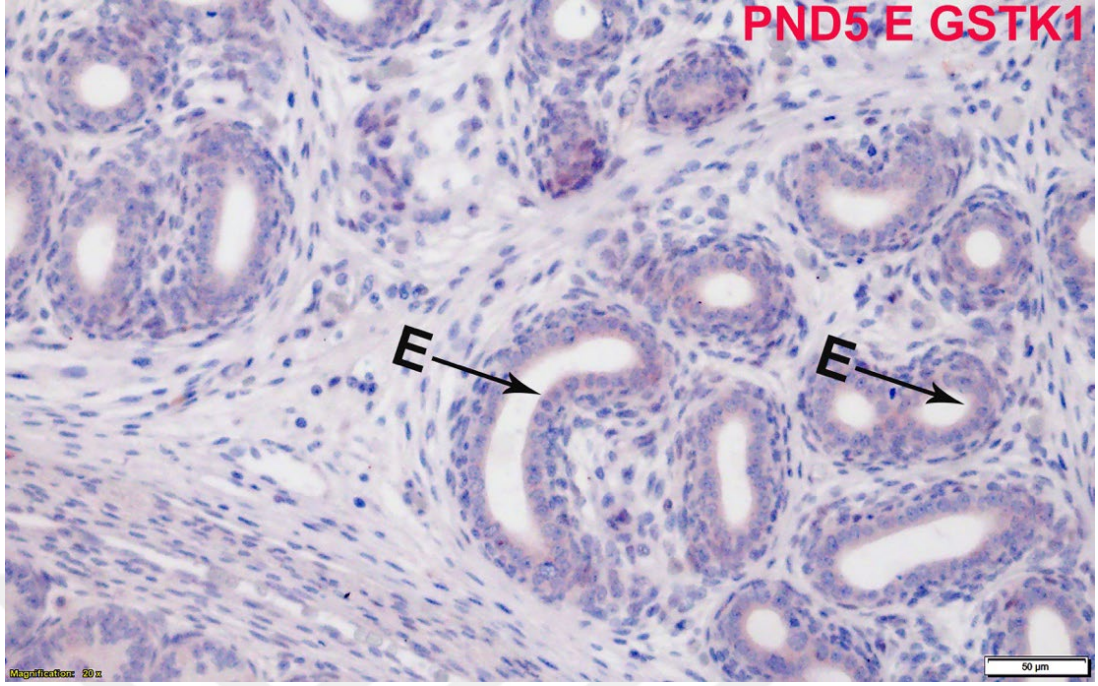
Şekil 4.4. PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Seminifer tübüller içerisinde gonositler (G) çok zayıf düzeyde sitoplazmik GSTK1 pozitifliği göstermektedir (-/+). Sertoli hücrelerinde (S) herhangi bir pozitiflik izlenmemektedir (-). Tübüller arası alanda yer alan Leydig hücrelerinde (L) de GSTK1 ifadesi gözlenmemektedir (-). Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



Şekil 4.5. PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Gonositlerde (G) sitoplazmik yerleşimli çok zayıf düzeyde boyanma izlenmektedir (-/+). Sertoli hücrelerinde (S) ve Leydig hücrelerinde (L) GSTK1 ifadesi gözlenmemektedir (-). Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 20 µm.



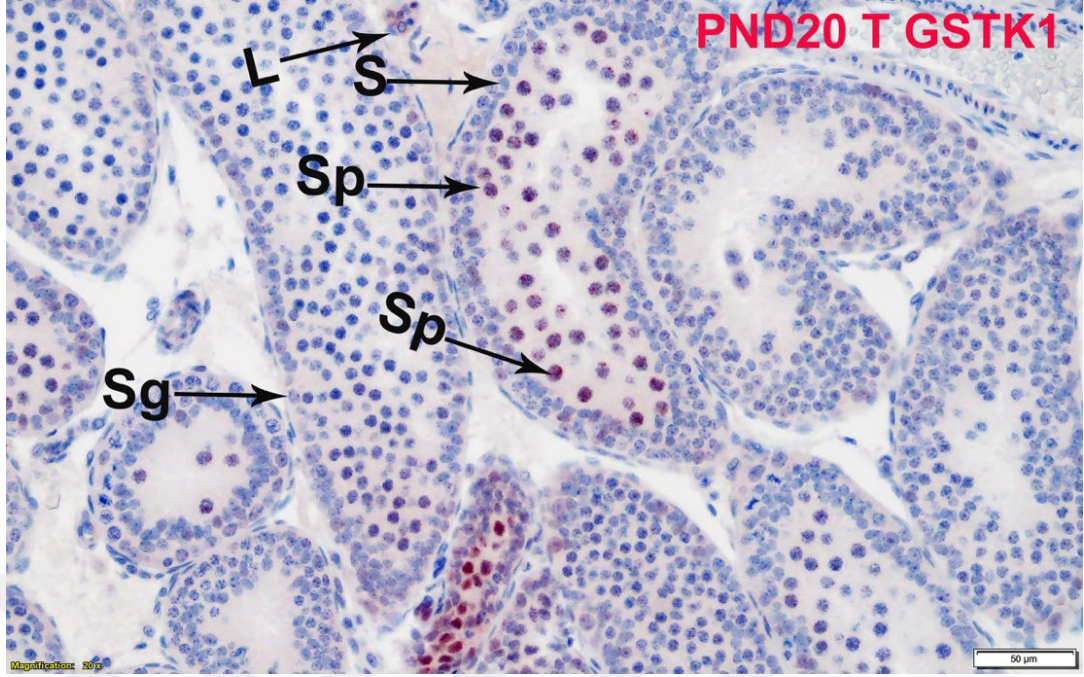
Şekil 4.6. PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) çok zayıf düzeyde sitoplazmik GSTK1 pozitifliği izlenmektedir (-/+). Kanal duvarı, düz kas tabakası ve vasküler yapılarda ifadesi saptanmamaktadır (-). Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



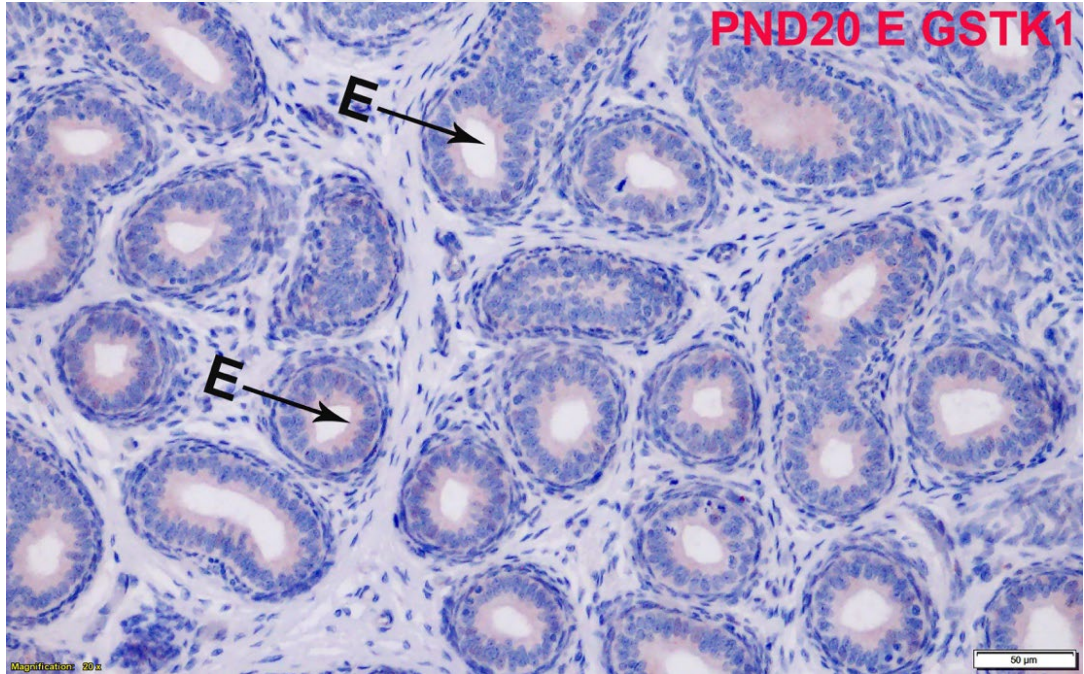
Şekil 4.7. PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) çok zayıf düzeyde sitoplazmik GSTK1 pozitifliği izlenmektedir (–/+). Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

4.3. Postnatal 20. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi

Postnatal 20. gün testis dokusundaki spermatogoniumlarda GSTK1 ifadesi, pozitiflik görülmedi (–). Spermatositlerde sitoplazmik yerleşimli zayıf düzeyde boyanma izlendi (+). Round spermatid, elongating spermatid ve spermatozoon hücrelerine rastlanmadı. Sertoli hücrelerinde çok zayıf düzeyde boyanma gözlemlendi (–/+). Leydig hücrelerinde zayıf düzeyde sitoplazmik GSTK1 pozitifliği saptandı (+). Peritübüler düz kas hücrelerinde ve damar duvarına ait yapılarda boyanma gözlemlenmedi (–) (Şekil 4.8). Epididimis dokusunda epitel hücrelerinde zayıf düzeyde pozitiflik izlendi (+). Başlangıç, kaput, korpus ve kauda segmentlerinde epitel hücrelerinin sitoplazmasında düzensiz yerleşimli boyanma saptandı. Kanal duvarı, düz kas tabakası ve vasküler yapılarda GSTK1 ifadesi gözlemlenmedi (–) (Şekil 4.9).



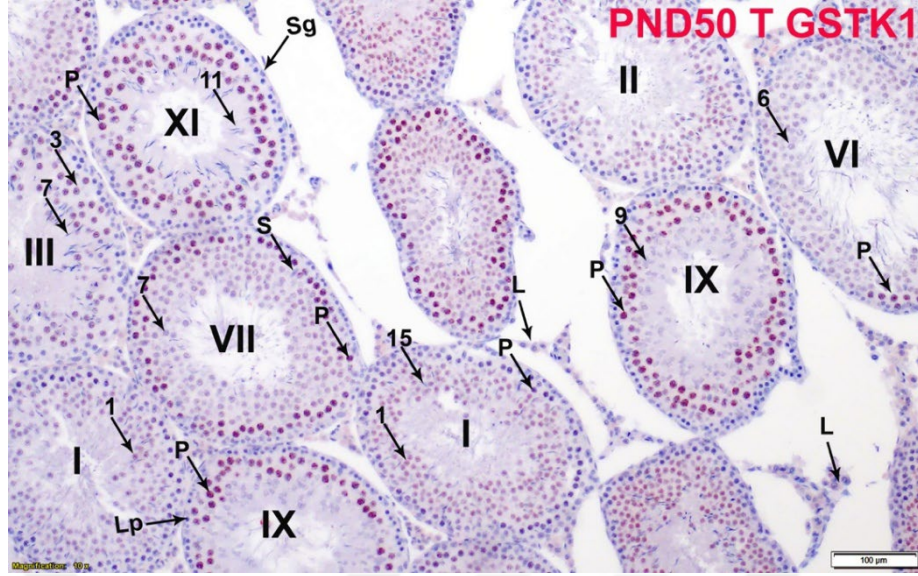
Şekil 4.8. PND20 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Spermatozitlerde (Sp) ve Leydig hücrelerinde (L) zayıf düzeyde (+) sitoplazmik pozitiflik izlenmektedir. Spermatogoniumlarda (Sg) ve Sertoli hücrelerinde (S) GSTK1'e yönelik herhangi bir pozitiflik izlenmemiştir (-). Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



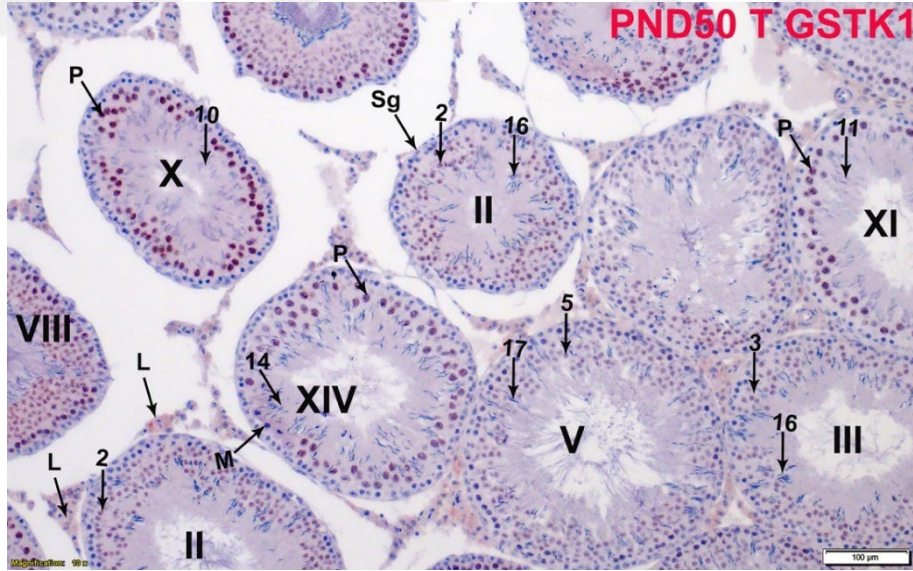
Şekil 4.9. PND20 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) zayıf düzeyde (+) sitoplazmik pozitiflik izlenmektedir. Kanal duvarı, düz kas tabakası ve vasküler yapılarda GSTK1 ifadesi izlenmemiştir (-). Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

4.4. Postnatal 50. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi

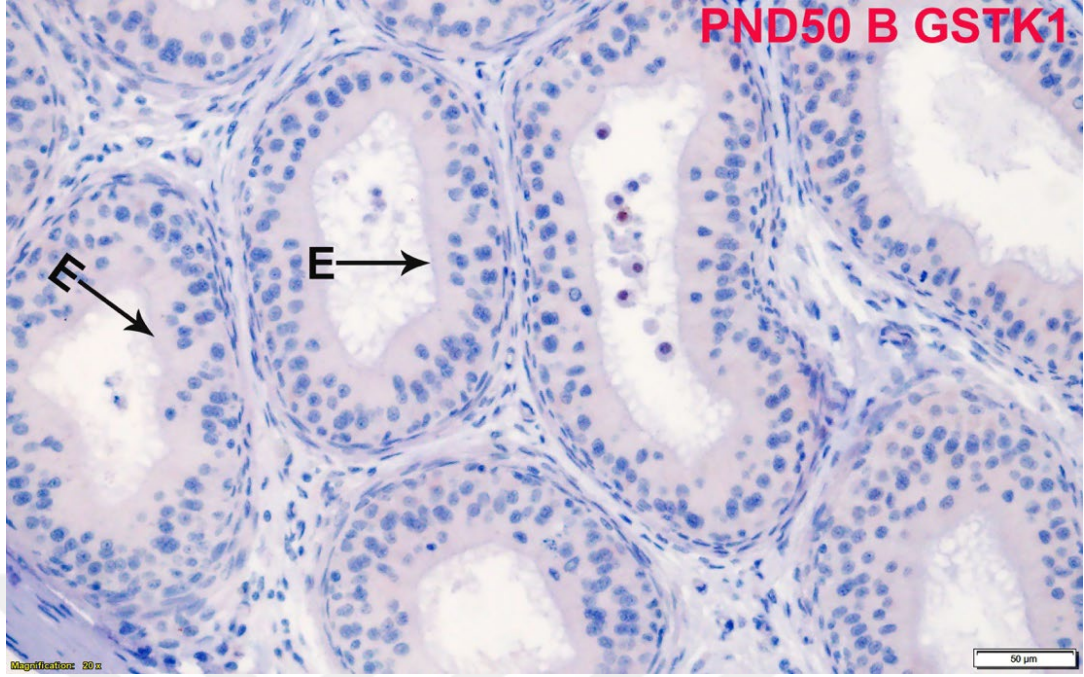
Postnatal 50. gün testis dokusundaki immünohistokimyasal değerlendirmeler, sıçan seminifer epitelinin klasik olarak tanımlanan 14 histolojik evresi ve spermatid gelişiminin 19 morfolojik basamağı temel alınarak gerçekleştirildi. Bu gelişim düzeyinde seminifer epitelde tüm germ hücre evrelerinin ayırt edilebilir olduğu saptandı. Değerlendirme, hücrelerin morfolojik ve konumsal özelliklerine göre gerçekleştirildi. GSTK1 ifadesi, her hücre tipi için ayrı ayrı analiz edildi. Primer spermatositler, özellikle pakiten evresinde yoğun olmak üzere, leptoten, zygoten, diploten ve diyakinez alt evrelerinde tanımlandı. Bu hücre grubunda orta düzeyde GSTK1 ifadesi izlendi (++). Round spermatidlerde (step 1–8) zayıf düzeyde pozitiflik saptandı (+). Elongating (step 9–12) ve elongated spermatidler (step 13–19) ise çok zayıf düzeyde pozitiflik görüldü (–/+). Spermatozoonlarda da benzer şekilde çok zayıf düzeyde GSTK1 boyanması izlendi (–/+). Sertoli hücrelerinde sitoplazmik alanda çok zayıf düzeyde GSTK1 immünreaktivitesi saptandı (–/+). Spermatogonyumlarda ise çok zayıf düzeyde GSTK1 ifadesi gözlemlendi (–/+). Leydig hücrelerinde zayıf düzeyde GSTK1 pozitifliği mevcuttu (+). Peritübüler düz kas hücreleri ve damar duvarı düz kaslarında GSTK1’e yönelik herhangi bir pozitiflik saptanmadı (–) (Şekil 4.10-4.11). Postnatal 50. gün sıçan epididimis dokusunda yapılan değerlendirmelerde GSTK1 ifadesinin yalnızca epitel hücreleri ile sınırlı kaldığı gözlemlendi. Diğer hücresel yapılarda herhangi bir immünpozitiflik gözlenmedi. Başlangıç segmentindeki epitel hücrelerinde zayıf düzeyde GSTK1 pozitifliği saptandı (+) (Şekil 4.12). Kaput epididimisteki epitel hücrelerinde zayıf ile orta düzey arasında değişen GSTK1 ifadesi gözlemlendi (+/++) (Şekil 4.13). Korpus epididimisteki epitel hücrelerinde GSTK1 ifadesinin orta düzeyde olduğu saptandı (++) (Şekil 4.14). Kauda epididimisteki epitel hücrelerinde ise zayıf ile orta düzeyde GSTK1 ifadesi gözlemlendi (+/++) (Şekil 4.15).



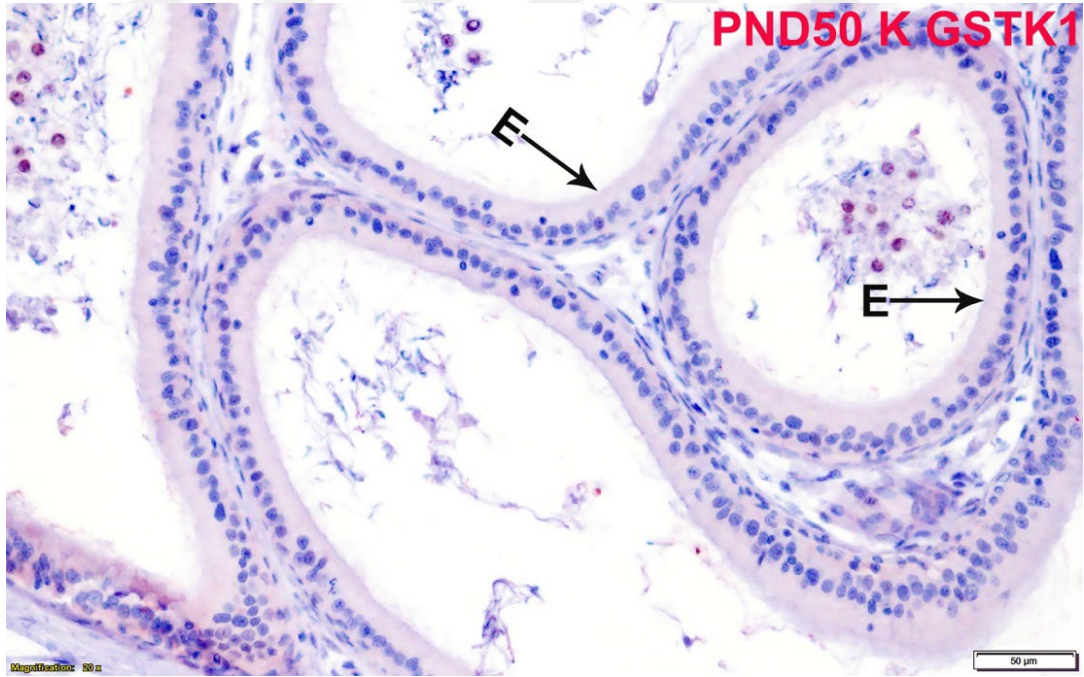
Şekil 4.10. PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Seminifer epiteldeki farklı gelişim dönemlerini temsil eden 14 evre, Roma rakamlarıyla (I–XIV) gösterilmiştir. Spermatidlerin morfolojik olarak ayırt edilen 19 gelişim aşaması ise sayılar ile ifade edilmiştir. Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S) ve Leydig hücresi (L) ilgili morfolojik özelliklerine göre işaretlenmiştir. Lp: Leptoten evresindeki primer spermatosit, P: Pakiten evresindeki primer spermatosit. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



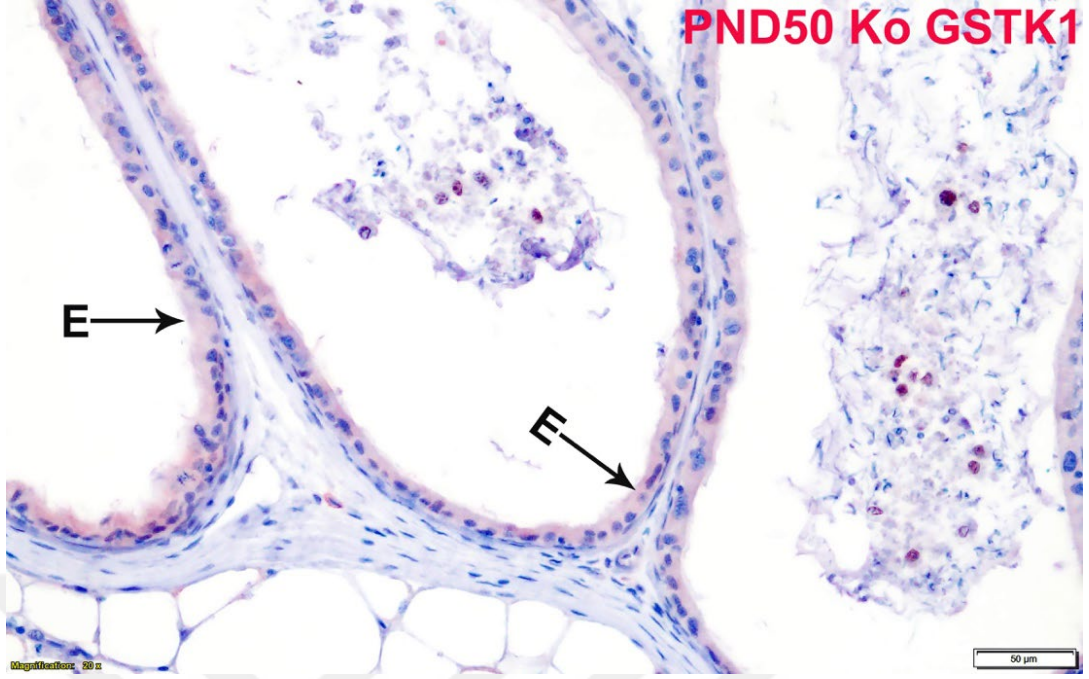
Şekil 4.11. PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Seminifer epiteldeki farklı gelişim dönemlerini temsil eden 14 evre, Roma rakamlarıyla (I–XIV) gösterilmiştir. Spermatidlerin morfolojik olarak ayırt edilen 19 gelişim aşaması ise sayılar ile ifade edilmiştir. Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Leydig hücresi (L) ve mayoz bölünme aşamasındaki spermatosit (M) morfolojik özelliklerine göre işaretlenmiştir. Lp: Leptoten evresindeki primer spermatosit, P: Pakiten evresindeki primer spermatosit. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



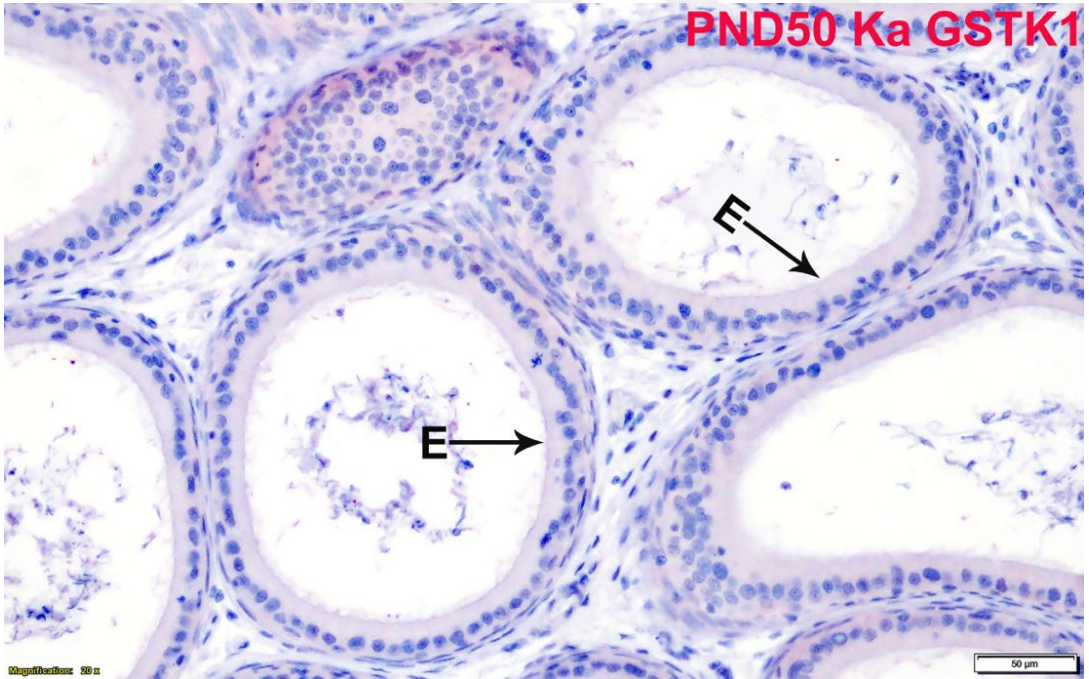
Şekil 4.12. PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (başlangıç segmenti) GSTK1 ifadesi. Başlangıç segmentindeki epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 pozitifliği izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.13. PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (kaput segmenti) GSTK1 ifadesi. Kaput segmentindeki epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 pozitifliği izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



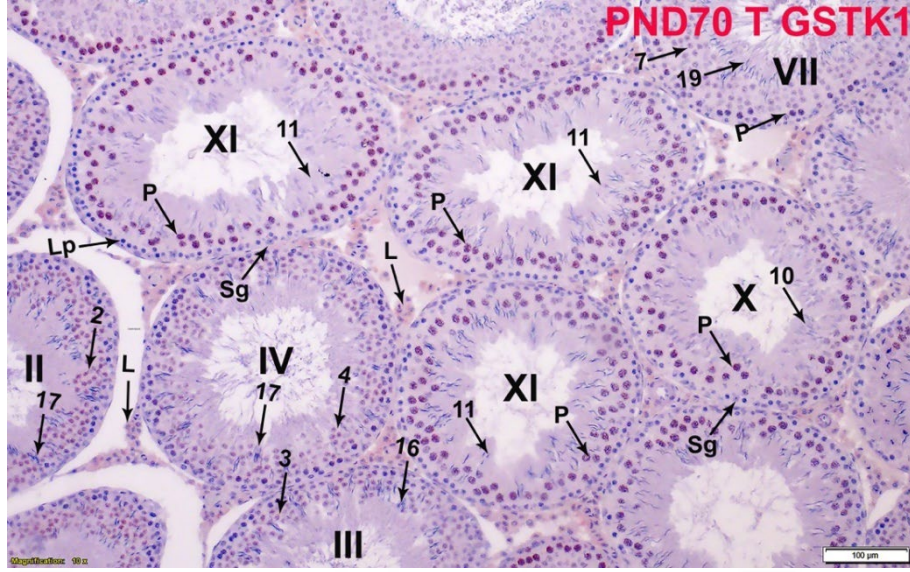
Şekil 4.14. PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (korpus segmenti) GSTK1 ifadesi. Kaput segmentindeki epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 pozitifliği izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



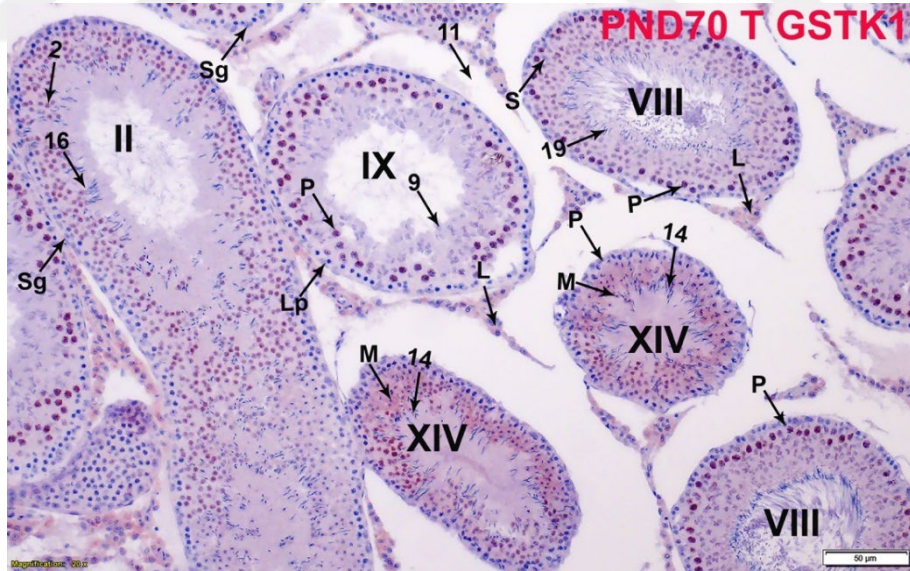
Şekil 4.15. PND50 dönemi sıçan epididimis dokusunda (kauda segmenti) GSTK1 ifadesi. Kaput segmentindeki epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 pozitifliği izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

4.5. Postnatal 70. Gün – GSTK1 İmmünreaktivitesi

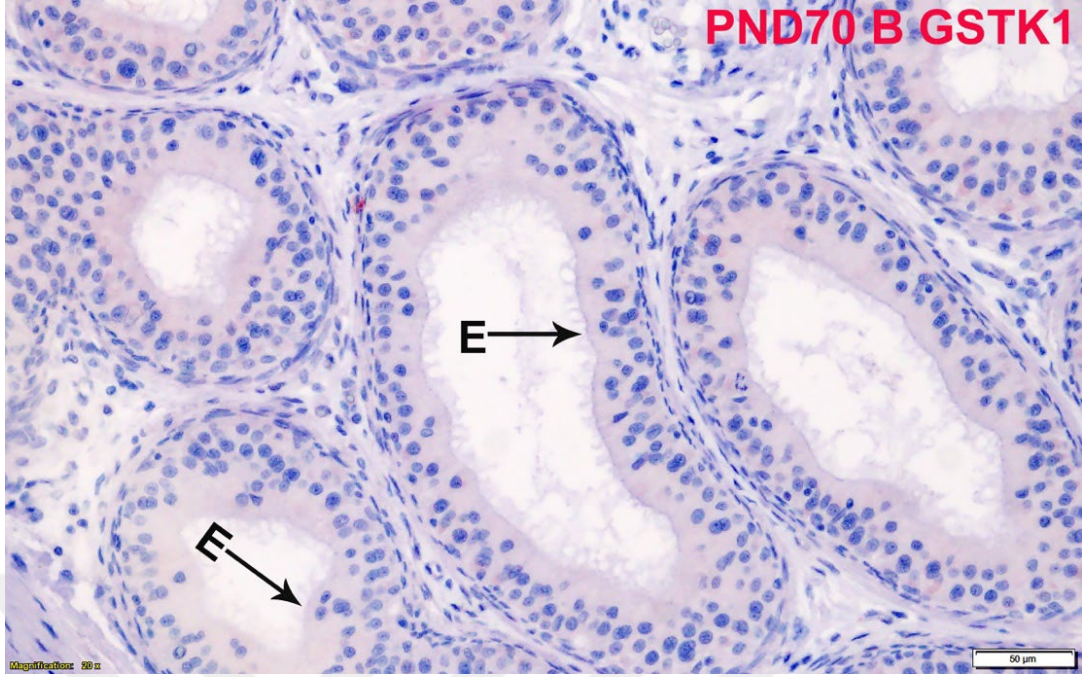
PND70 dönemine ait sıçan testis dokusunda seminifer epitel, gelişimini tamamlamış olup karakteristik 14 evreye göre sınıflandırıldı. Spermatidlerin farklılaşma süreci ise klasik olarak 1'den 19'a kadar tanımlanan aşamalara göre değerlendirildi. Bu bağlamda elongated spermatidlerin 13–19. aşamalarda yer aldığı göz önüne alınarak değerlendirme yapıldı. Primer spermatositlerin ise zygoten, leptoten, pakiten ve diyakinez gibi farklı evrelerde bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu çalışmada primer spermatositler genel başlık altında birlikte değerlendirildi. Spermatogonyumlarda zayıf düzeyde GSTK1 ifadesi gözlemlendi (+). Primer spermatositler, özellikle pakiten evresinde belirgin olmak üzere, orta düzeyde GSTK1 pozitifliği sergiledi (++). Round spermatidler (+) ve elongating/elongated spermatidler (+) de sitoplazmik düzeyde zayıf-orta GSTK1 boyanması gözlemlendi. Spermatozoonlarda ise GSTK1 pozitifliği, oldukça sınırlı düzeyde olup çok zayıf bir boyanma paterni sergiledi (-/+). Sertoli hücrelerinde çok zayıf boyanma (-/+) gözlenirken, Leydig hücrelerinde zayıf düzeyde sitoplazmik ifade tespit edildi (+). Peritübüler myoid hücreler ve damar duvarı düz kas tabakasında herhangi bir GSTK1 pozitifliği izlenmedi (-) (Şekil 4.16-4.17). Epididimis dokusuna ait incelemelerde başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgeleri ayrı ayrı değerlendirildi. Başlangıç segmenti epitelinde GSTK1 pozitifliği zayıf-orta (+/++) düzeyde saptandı (Şekil 4.18). Kaput ve korpus epididimis epitel hücrelerinde ise orta (++) düzeyde pozitiflik gözlemlendi (Şekil 4.19-4.20). Kauda segmentindeki GSTK1 ifadesi daha yoğun olup epitel hücrelerinde güçlü boyanma (+++/++) gözlemlendi (Şekil 4.21). Bu boyanma çoğunlukla sitoplazmik karakterdeydi ve apikal bölgelerde daha belirgindi. Kanal duvarı kas tabakası ve damar yapılarında herhangi bir boyanma saptanmadı (-).



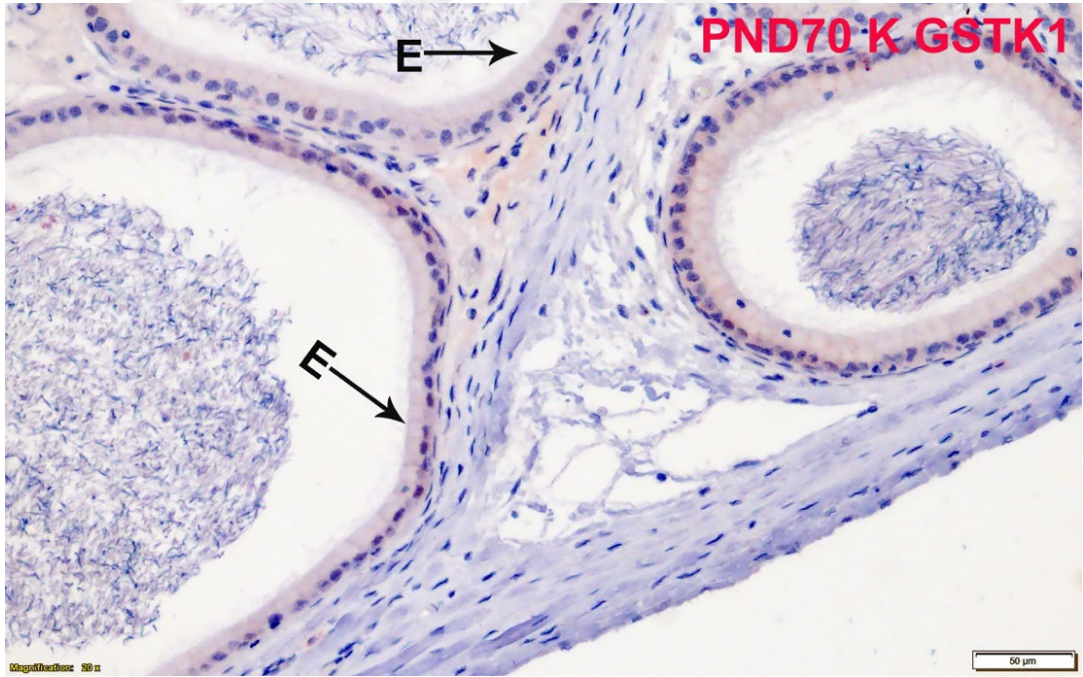
Şekil 4.16. PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Seminifer epitelin evreleri Romen rakamlarıyla, spermatidlerin gelişim basamakları ise sayı ile gösterilmiştir. Sayılar round, elongating ve elongated spermatidlerin farklılaşma aşamalarını ifade etmektedir. Spermatogonyum (Sg), leptoten evresindeki primer spermatosit (Lp), pakiten evresindeki primer spermatosit (P), Sertoli hücresi (S), Leydig hücresi (L) ve mayoz bölünme evresindeki spermatosit (M) oklarla gösterilmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



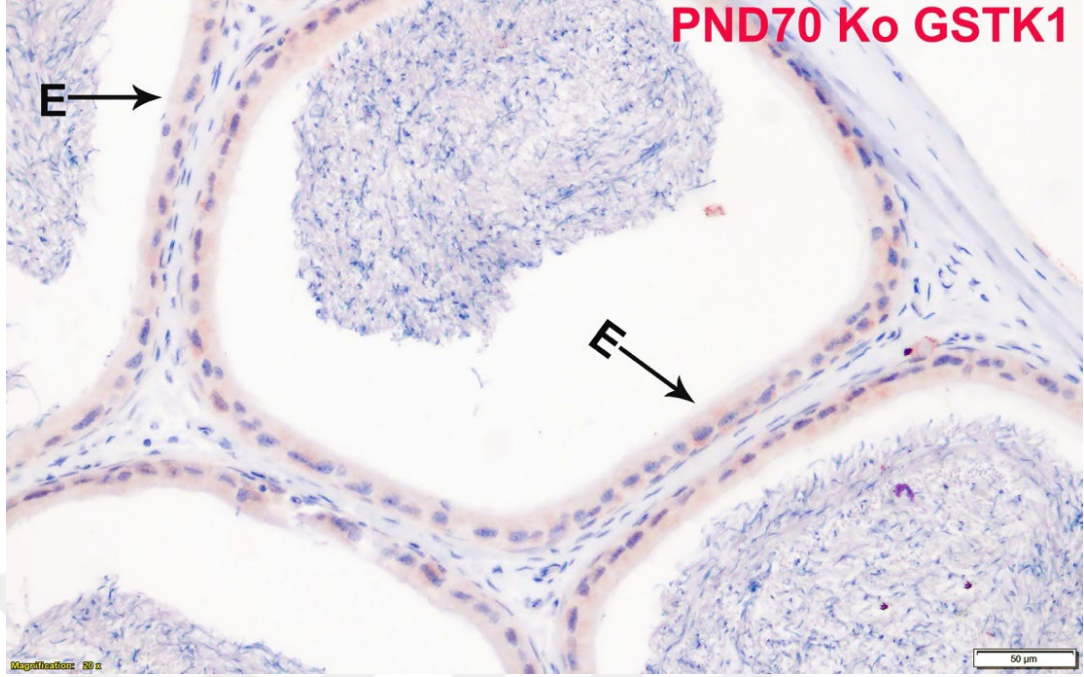
Şekil 4.17. PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTK1 ifadesi. Seminifer epitelin evreleri Romen rakamlarıyla, spermatidlerin gelişim basamakları ise sayı ile gösterilmiştir. Sayılar round, elongating ve elongated spermatidlerin farklılaşma aşamalarını ifade etmektedir. Spermatogonyum (Sg), leptoten evresindeki primer spermatosit (Lp), pakiten evresindeki primer spermatosit (P), Sertoli hücresi (S), Leydig hücresi (L) ve mayoz bölünme evresindeki spermatosit (M) oklarla gösterilmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



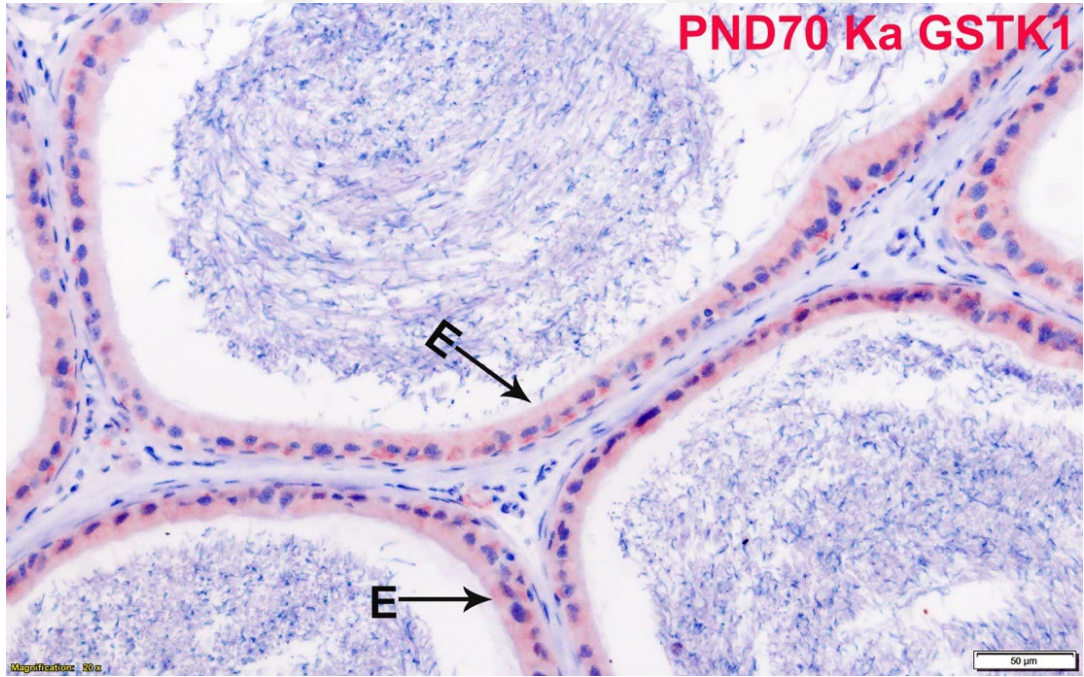
Şekil 4.18. PND70 dönemi sıçan epididimisinin başlangıç segmentinde GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 immünreaktivitesi izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.19. PND70 dönemi sıçan epididimisinin kaput segmentinde GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 immünreaktivitesi izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.20. PND70 dönemi sıçan epididimisinin korpus segmentinde GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 immünreaktivitesi izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.21. PND70 dönemi sıçan epididimisinin kauda segmentinde GSTK1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) sitoplazmik GSTK1 immünreaktivitesi izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

GSTK1'in farklı postnatal dönemlerdeki immünohistokimyasal dağılımı, testis ve epididimis dokularında hücre tipi ve anatomik lokalizasyona göre yapılan semikantitatif değerlendirmelerle analiz edilmiştir. PND5, PND20, PND50 ve PND70 dönemlerine ait bulgular, her bir hücre tipi için ayrı ayrı skorlanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Postnatal gelişim aşamalarındaki sıçanlarda GSTK1 immün reaksiyonunun subjektif değerlendirmesi.

Doku	Hücre Tipi	PND5	PND20	PND50	PND70
Testis	Spermatogonyum	(Gonosit) -/+	-	-/+	+
	Spermatosit	0	+	++	++
	Round spermatid	0	0	+	+
	Elongating/elongated spermatid	0	0	-/+	+
	Spermatozoon	0	0	-/+	-/+
	Sertoli hücreleri	-	-	-/+	-/+
	Leydig hücreleri	-	+	+	+
	Peritubular myoid hücreler	-	-	-	-
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
Epididimis başlangıç segmenti	Epitel hücreleri	-/+	+	+	+/++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-
Kapus epididimis	Epitel hücreleri	-/+	+	+/++	++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-
Korpus epididimis	Epitel hücreleri	-/+	+	++	++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-
Kauda epididimis	Epitel hücreleri	-/+	+	+/++	+/++++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-

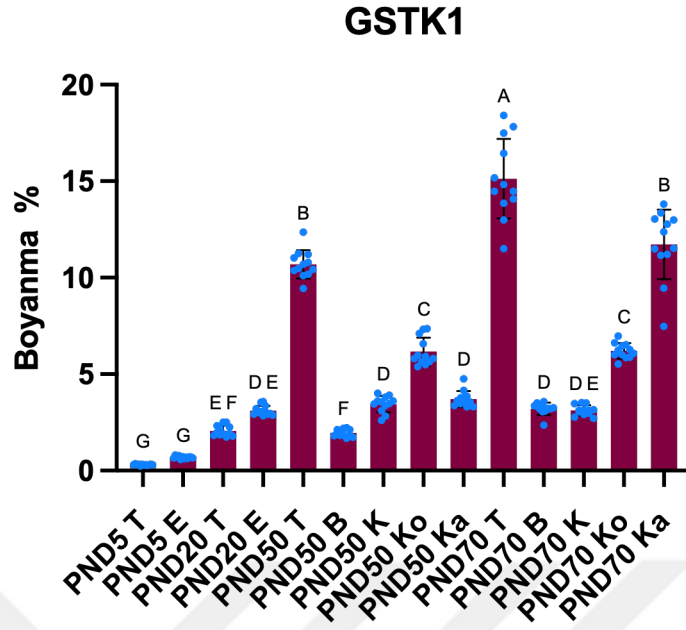
- (boyanma yok), -/+ (çok zayıf boyanma), + (zayıf boyanma), +/+ (zayıf-orta boyanma), ++ (orta boyanma), ++/+++ (orta-güçlü boyanma), +++ (güçlü boyanma)

4.6. GSTK1 Kantitatif Analizi

Testis dokusunda, GSTK1 immünreaktivitesine ait en yüksek boyanma oranı postnatal 70. gün (PND70 T) grubunda tespit edildi. Bu grup, tüm diğer testiküler gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bir ortalama değere sahipti (A). PND70 T grubunu izleyen ikinci yüksek değer, postnatal 50. gün testis (PND50 T) grubunda görülmüş olup, bu grup PND70 T'den anlamlı olarak düşük, ancak

PND20 ve PND5 gruplarından anlamlı şekilde daha yüksek düzeye sahipti (B). PND20 testis dokusu (PND20 T), PND50 T'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, ancak PND5 testisine göre daha yüksek düzeye sahipti (D/E). PND5 T ise, tüm testis grupları arasında en düşük GSTK1 boyanma oranına sahipti ve harf grubu açısından yalnızca PND5 E ile aynı kategoride yer almakta (G), diğer tüm testiküler gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık gösterdi. Epididimis dokusu incelendiğinde, en yüksek GSTK1 boyanması postnatal 70. gün kauda epididimis (PND70 Ka) grubunda belirlendi. Bu grup, hem tüm diğer epididimal segmentlerden hem de testiküler PND50 ve PND70 gruplarının dışında kalan testis gruplarından anlamlı olarak daha yüksek boyanma yüzdesine sahipti (B). İkinci sırada PND50 testis (PND50 T) ve PND50 kauda epididimis (PND50 Ka) grupları yer almakta olup, bu iki grup birbirine istatistiksel olarak benzer, fakat PND70 Ka ile anlamlı düzeyde farklılık gösterdi (B ve C).

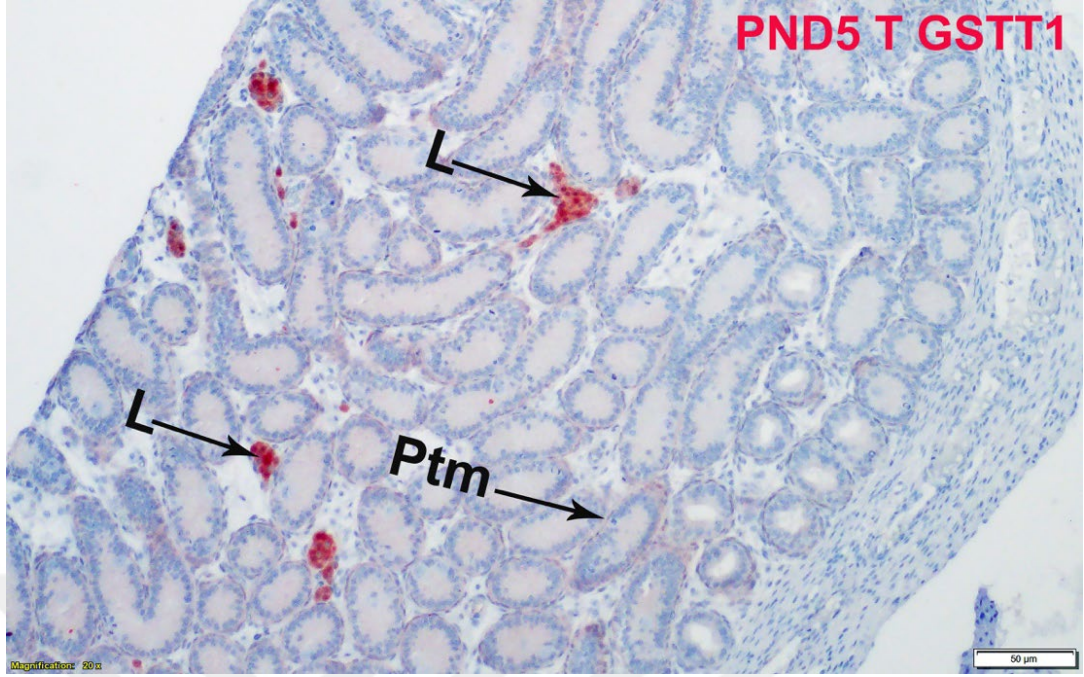
Epididimis segmentlerinin değerlendirmesinde PND50 kaput (PND50 K) ve PND70 korpus (PND70 Ko) benzer boyanma yüzdeleri gösterdi ve aynı harf grubunda yer aldılar (D). Bu iki segment, kauda segmentine göre istatistiksel olarak daha düşük değerlere sahipti. PND50 başlangıç segmenti (PND50 B), PND70 başlangıç (PND70 B) ve PND70 kaput (PND70 K) grupları, harf grubu olarak D/E kategorisinde bulunmakta olup hem kendi içlerinde hem de diğer epididimal segmentlerle belirli ölçüde farklılıklar gösterdi. En düşük GSTK1 ifadesine sahip epididimis segmentleri, PND5 başlangıç (PND5 B) ve PND5 epididimis tamamı (PND5 E) olup, bu gruplar PND5 testis ile birlikte aynı harf grubunda (G) yer aldı. Bu bulgu, neonatal dönem testis ve epididimis dokusundaki GSTK1 ifadesinin minimal düzeyde olduğunu ortaya koydu. Bu kantitatif veriler, her grup için farklı bireylerden elde edilen 12 fotoğraf üzerinden yapılan ölçümlerle belirlendi ve ImageJ yazılımında Color Deconvolution yöntemi kullanılarak analiz edildi. Bütün görüntüler, aynı büyütmede kaydedildi ve veriler arası karşılaştırılabilirlik sağlandı. Boyanma yüzdesine göre elde edilen sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile istatistiksel olarak test edildi ve anlamlı farklılıklar harf gruplandırması ile gösterildi (Şekil 4.22).



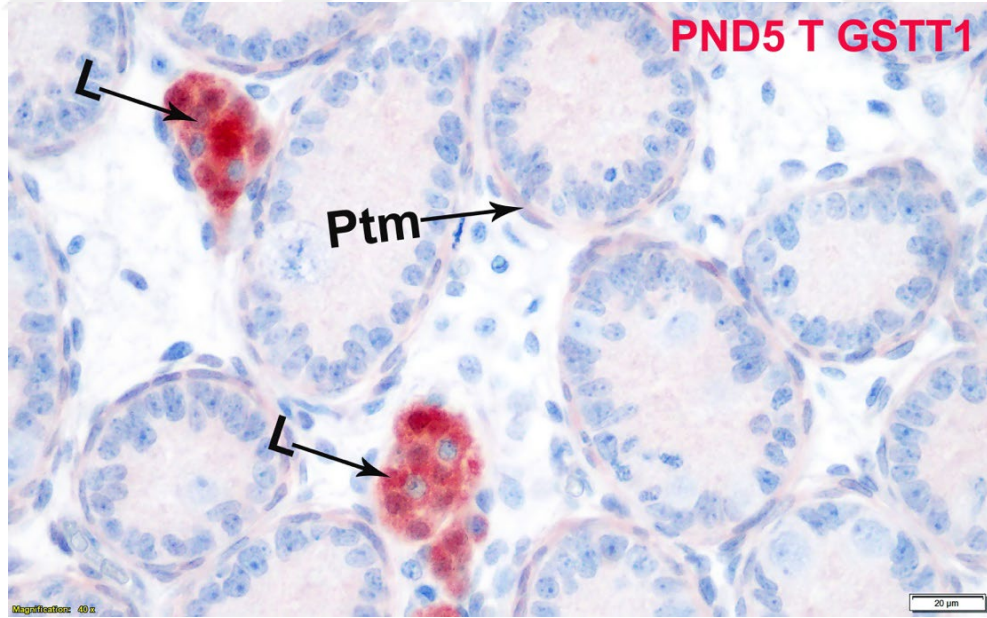
Şekil 4.22. GSTK1 immünreaktivitesine ilişkin kantitatif analiz sonuçları. Postnatal gün 5, 20, 50 ve 70'e ait testis (T), epididimis başlangıç (B), kaput (K), korpus (Ko) ve kauda (Ka) bölgelerinden elde edilen boyanma yüzdesi değerleri gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal pozitiflik oranları ImageJ programında “Color Deconvolution” yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0.05$).

4.7. Postnatal 5. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi

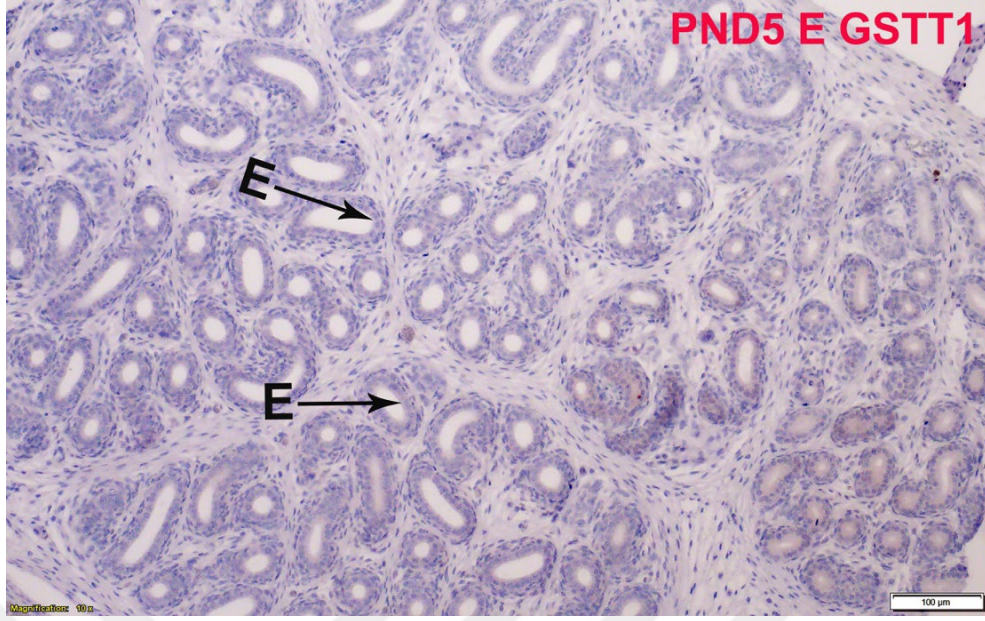
Postnatal 5. gün testis dokusunda GSTT1 immünreaktivitesi oldukça sınırlıdır. Seminifer epitelde yalnızca gonositler ve Sertoli hücreleri ayırt edilebildi. Bu iki hücre popülasyonundan yalnızca peritübüler bölgeye komşu bazı hücrelerde zayıf düzeyde GSTT1 pozitifliği gözlemlendi. Gonositlerde GSTT1 ifadesine rastlanmadı (–). Sertoli hücrelerinde de herhangi bir pozitiflik izlenmedi (–). Buna karşın, interstisyel bölgede bulunan Leydig hücrelerinde belirgin düzeyde GSTT1 pozitifliği (+++) gözlenirken, peritübüler myoid hücrelerde çok zayıf düzeyde reaksiyon saptandı (–/+) (Şekil 4.23-4.24). Epididimis dokusunun tüm segmentlerindeki (başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda) epitel hücrelerinde GSTT1 pozitifliği çok zayıf düzeyde (–/+) saptandı. Kanal duvarı kas tabakası ve damar duvarı düz kaslarında GSTT1 ifadesine rastlanmadı (–) (Şekil 4.25-4.26).



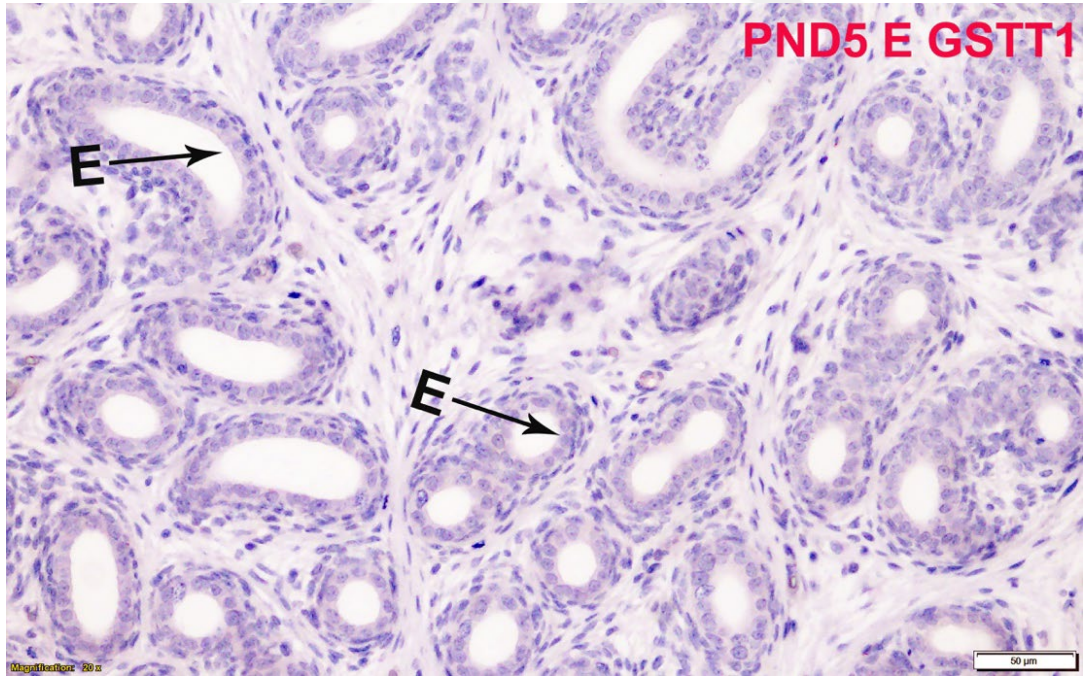
Şekil 4.23. PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Leydig hücrelerinde (L) güçlü düzeyde sitoplazmik pozitiflik gözlenmiştir. Peritübüler myoid hücrelerde (Ptm) ise çok zayıf düzeyde GSTT1 immünreaktivitesi izlenmektedir. Seminifer tübüllerdeki gonositler ve Sertoli hücrelerinde GSTT1 pozitifliği bulunmamaktadır. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.24. PND5 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Leydig hücrelerinde (L) yoğun sitoplazmik GSTT1 pozitifliği izlenmiştir. Peritübüler myoid hücrelerde (Ptm) ise GSTT1 immünreaktivitesi çok zayıf düzeydedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 20 µm.



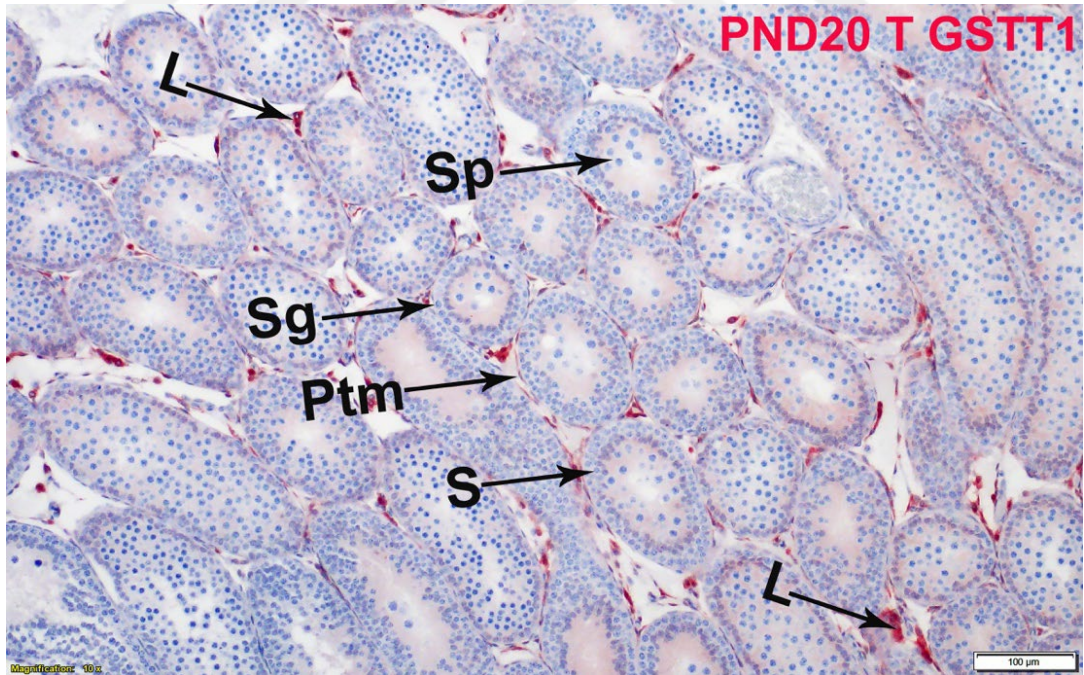
Şekil 4.25. PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi. Tüm segmentlerde epitel hücrelerinde (E) çok zayıf düzeyde sitoplazmik GSTT1 pozitifliği izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



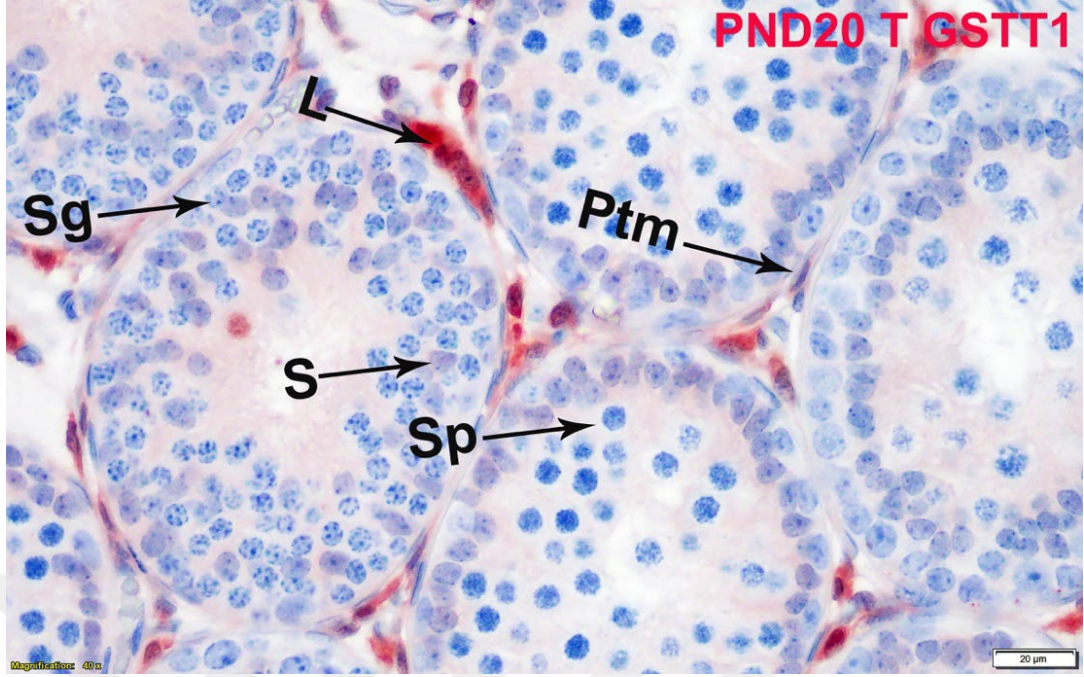
Şekil 4.26. PND5 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) GSTT1 pozitifliği çok zayıf düzeyde ve sınırlı dağılım göstermektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

4.8. Postnatal 20. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi

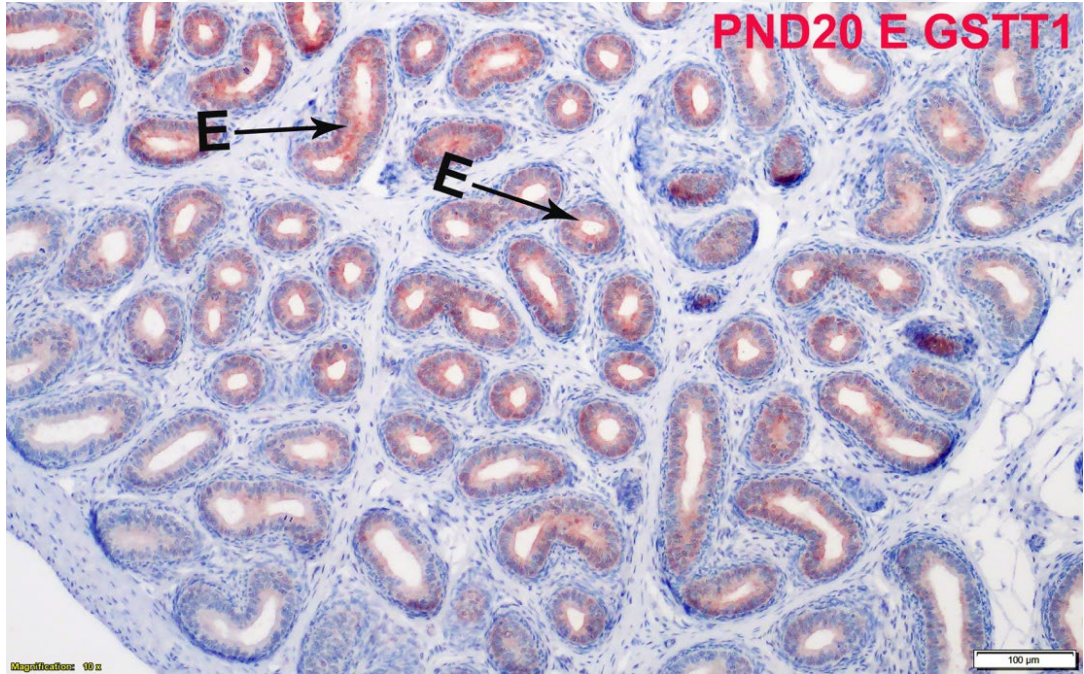
PND20 dönemine ait testis dokusunda GSTT1 immünreaktivitesi, hücre tiplerine özgü farklılıklar gösterdi. Seminifer epitelde spermatogoniumlar çok zayıf düzeyde boyanma (-/+) sergilerken, primer spermatositlerde de benzer şekilde çok zayıf düzeyde sitoplazmik GSTT1 pozitifliği izlendi (-/+). Sertoli hücreleri çok zayıf düzeyde GSTT1 immünreaktivitesi gösterdi (-/+). Peritübüler myoid hücrelerde zayıf düzeyde pozitiflik (+) saptanırken, Leydig hücrelerinde güçlü boyanma (+++) belirlendi. Bu dönemde round spermatid, elongating spermatid ve spermatozoon gibi ileri evre germ hücreleri henüz gelişmediğinden, bu hücrelerde GSTT1 ifadesine saptanmadı. (Şekil 4.27-4.28). Epididimis dokusuna ait değerlendirmelerde başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgelerinin epitel hücrelerinde orta düzeyde sitoplazmik GSTT1 pozitifliği (++) izlendi. Bu ifade, segmentler arasında benzer yoğunlukta olup, eşit şekilde dağıldı. Kanal kas tabakası ve damar yapılarında herhangi bir GSTT1 pozitifliği gözlenmedi (-) (Şekil 4.29-4.30).



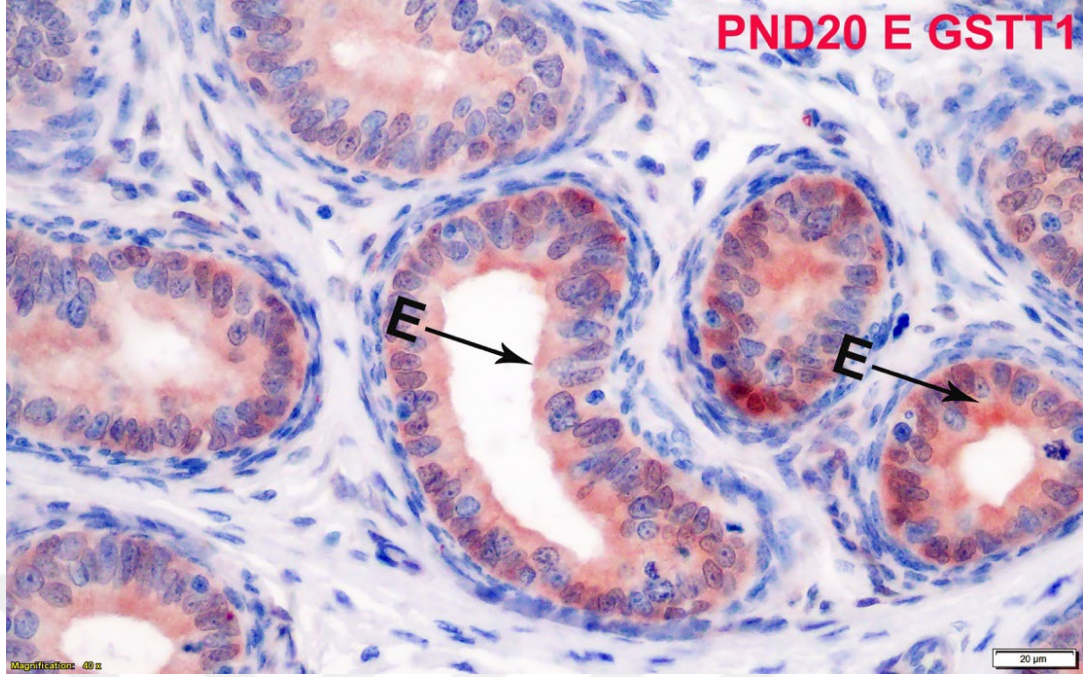
Şekil 4.27. PND20 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelde spermatogoniumlar (Sg), primer spermatositler (Sp) ve Sertoli hücreleri (S) ile birlikte interstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri (L) ve peritübüler myoid hücreler (Ptm) GSTT1 immünreaktivitesi göstermektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



Şekil 4.28. PND20 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelde spermatogoniumlar (Sg), primer spermatositler (Sp) ve Sertoli hücreleri (S) ile birlikte interstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri (L) ve peritübüler myoid hücreler (Ptm) GSTT1 immünreaktivitesi göstermektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 20 µm.



Şekil 4.29. PND20 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi. Tüm segmentlerde epitel hücrelerinde (E) GSTT1 immünreaktivitesi gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.

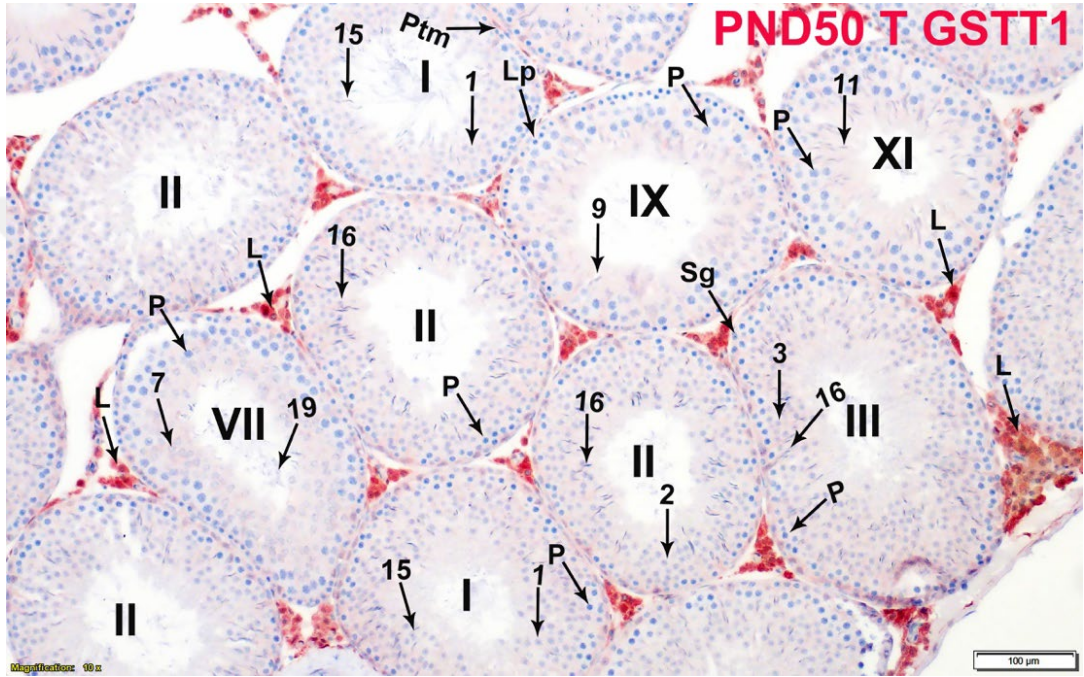


Şekil 4.30. PND20 dönemi sıçan epididimis dokusunda GSTT1 ifadesi. Tüm segmentlerde epitel hücrelerinde (E) GSTT1 ifadesi izlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 20 µm.

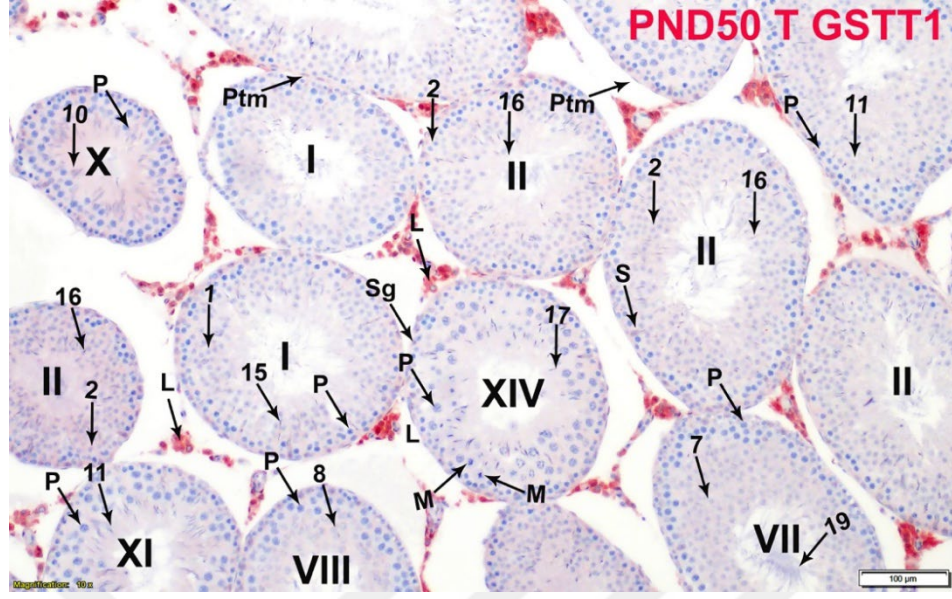
4.9. Postnatal 50. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi

Postnatal 50. gün testis dokusuna ait immünohistokimyasal değerlendirmede germ hücre serilerinin erken ve ileri farklılaşma evrelerinde genellikle çok zayıf düzeyde GSTT1 ifadesi gözlemlendi. Seminifer epitelin yapısal organizasyonu, 14 farklı evre (stage I–XIV) ve 19 farklı spermatid gelişim aşamasına göre değerlendirildi. Bu kapsamda spermatogonyum, primer spermatosit, round spermatid, elongating/elongated spermatid ve spermatozoonlarda çok zayıf düzeyde (–/+) sitoplazmik GSTT1 boyanması tespit edildi. Leptoten, zygoten, pakiten ve diploten aşamalarında olan primer spermatositler tanımlanabildi ve genel olarak tüm aşamalarda benzer şekilde sınırlı immünreaktivite gözlemlendi. Sertoli hücreleri de bu dönemde GSTT1 yönünden immünnegatif veya çok zayıf düzeyde pozitiflik gösterdi (–/+). Leydig hücrelerinde ise GSTT1’e karşı belirgin ve güçlü sitoplazmik ifade gözlemlendi (+++). Bu bulgular, postnatal 50. gündeki bu hücrelerin GSTT1 protein ifadesi bakımından aktif olduğunu göstermektedir. Peritübüler myoid hücrelerde ise zayıf düzeyde pozitiflik (+) saptandı. Ancak damar düz kas hücrelerinde herhangi bir ifade saptanmadı (–) (Şekil 4.31-4.33). Postnatal 50. gün sıçan epididimis dokusunda

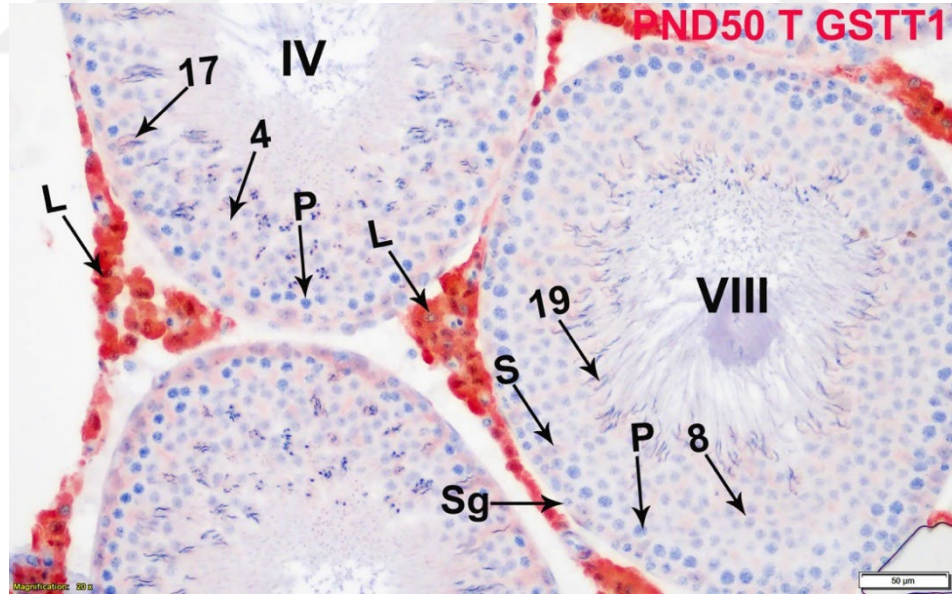
GSTT1 ifadesi, segmentlere göre farklılık gösterdi. Başlangıç segmentinde epitel hücrelerinde zayıf düzeyde pozitiflik gözlemlendi (+). Kaput ve korpus epididimis segmentlerinde orta düzeyde GSTT1 ifadesi görüldü (++). Kauda epididimis epitelinde ise güçlü düzeyde GSTT1 immünreaktivitesi saptandı (+++). Kanal duvarı, düz kas tabakası ve damar yapılarında herhangi bir GSTT1 pozitifliği izlenmedi (–) (Şekil 4.34-4.37).



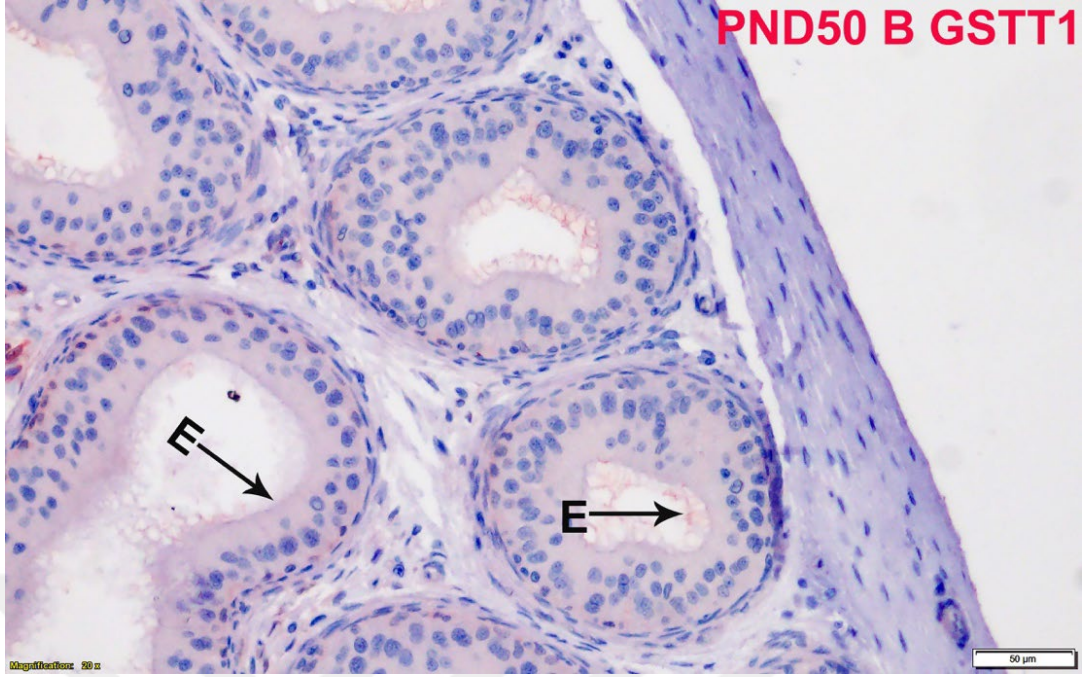
Şekil 4.31. PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer tübüller içinde gözlenen Roma rakamları, seminifer epitelin gelişim evrelerini (I–XIV), sayılar ise farklı spermatid gelişim aşamalarını (1–19) ifade etmektedir. Spermatogonyum (Sg), primer spermatosit (P), leptoten evresindeki primer spermatosit (Lp), Leydig hücresi (L) ve peritübüler myoid hücreler (Ptm) gösterilmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



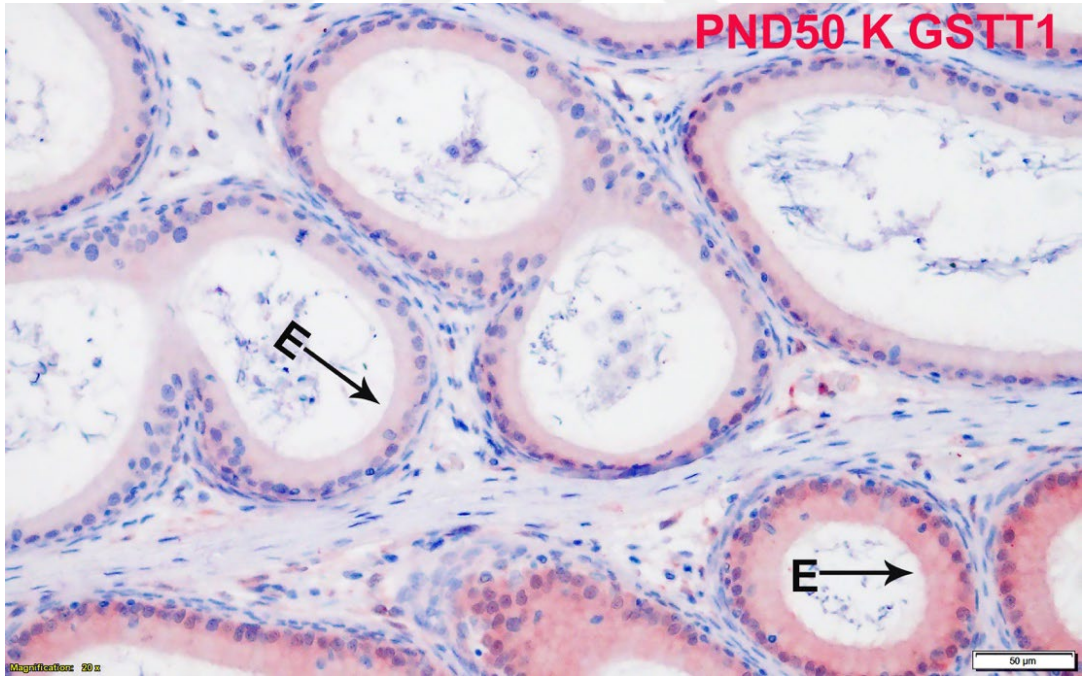
Şekil 4.32. PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelde yer alan Roma rakamları, seminifer epitelin evrelerini (stage I–XIV), Arap sayıları ise spermatidlerin farklı gelişim aşamalarını (1–19) göstermektedir. Spermatogonyum (Sg), primer spermatozoid (P), leptoten evresindeki primer spermatozoid (Lp), mayoz evredeki spermatozoid (M), Sertoli hücresi (S), Leydig hücresi (L) ve peritübüler myoid hücreler (Ptm) gösterilmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



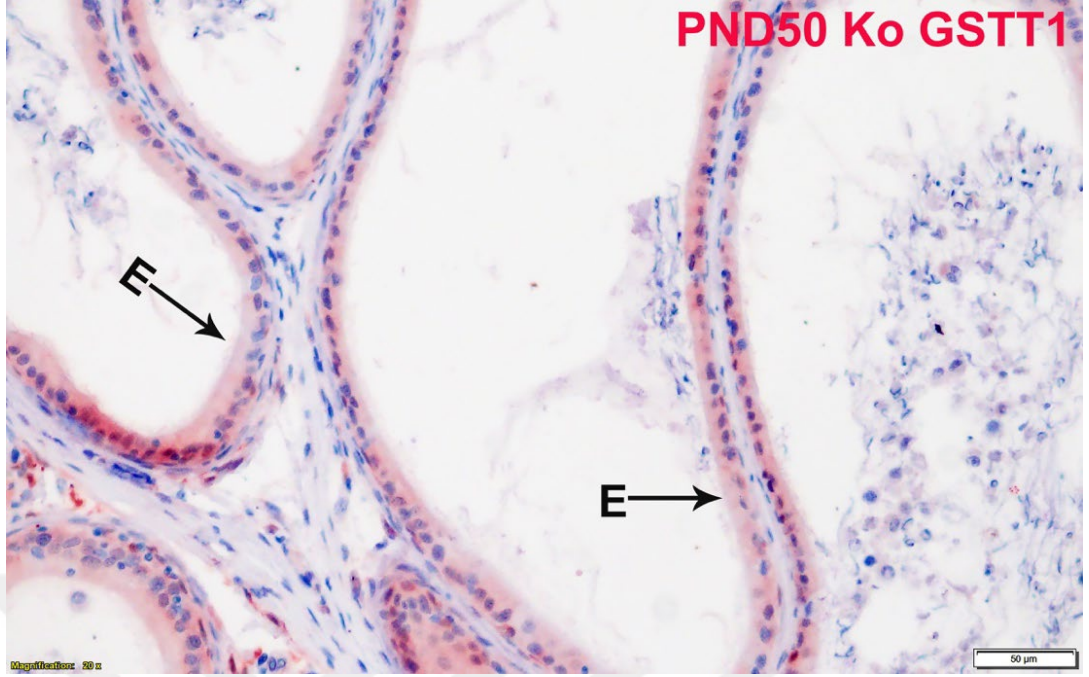
Şekil 4.33. PND50 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelde yer alan Roma rakamları seminifer epitel evrelerini (IV ve VIII), sayılar ise spermatidlerin gelişim aşamalarını (4, 8, 17 ve 19) göstermektedir. Spermatogonyum (Sg), primer spermatozoid (P), Sertoli hücresi (S) ve Leydig hücresi (L) işaretlenmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



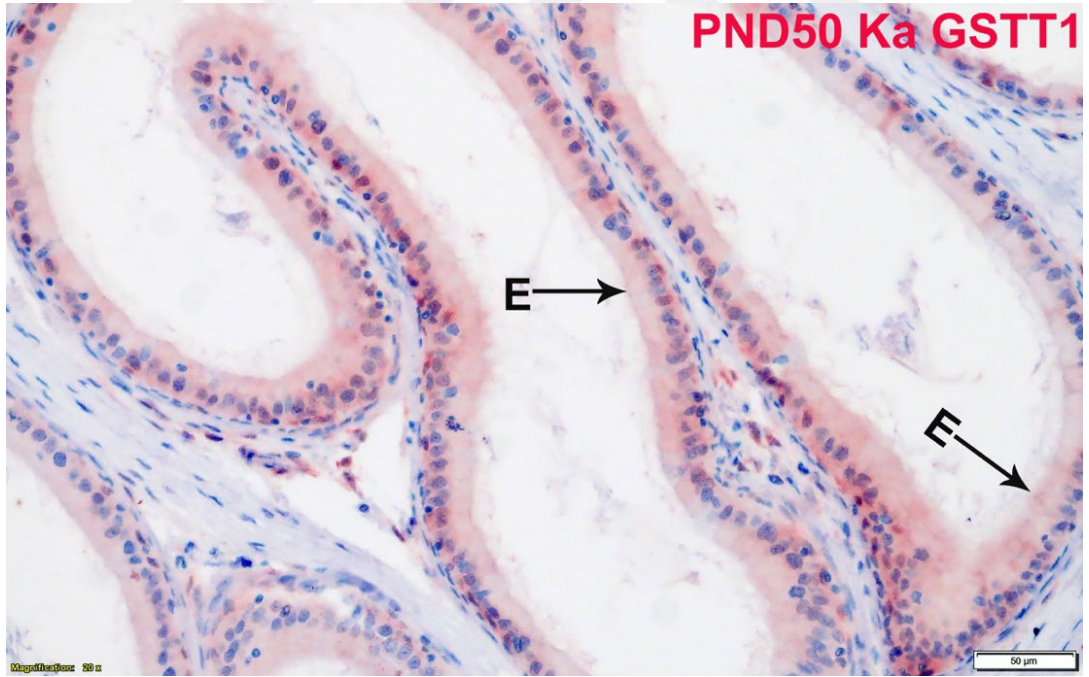
Şekil 4.34. PND50 dönemi sıçan epididimisinin başlangıç segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) GSTT1 pozitifliği gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.35. PND50 dönemi sıçan epididimisinin kaput segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) GSTT1 pozitifliği gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



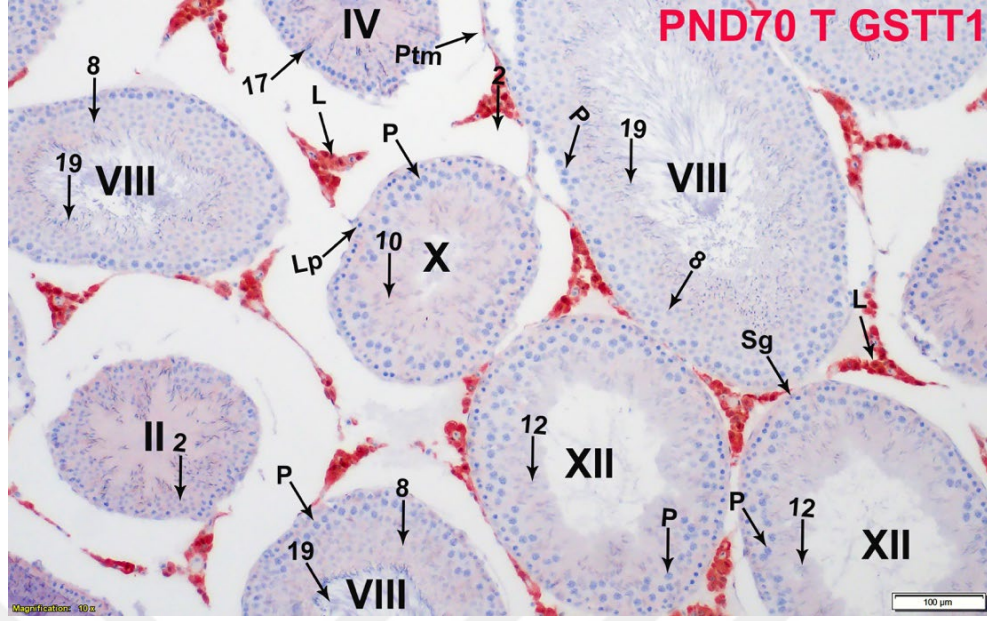
Şekil 4.36. PND50 dönemi sıçan epididimisinin korpus segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) GSTT1 pozitifliği gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



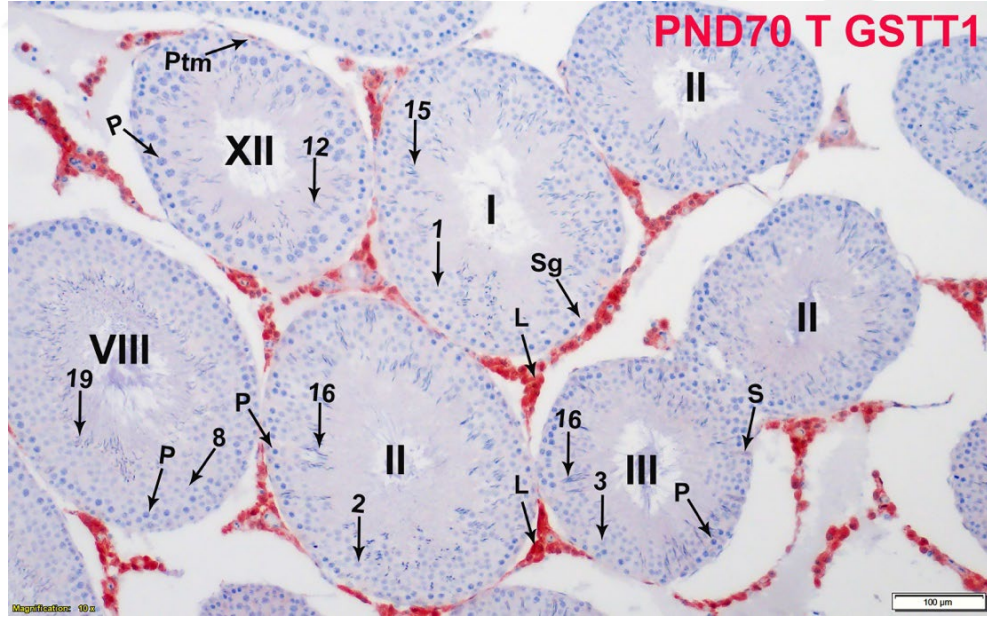
Şekil 4.37. PND50 dönemi sıçan epididimisinin kauda segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) GSTT1 pozitifliği gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

4.10. Postnatal 70. Gün – GSTT1 İmmünreaktivitesi

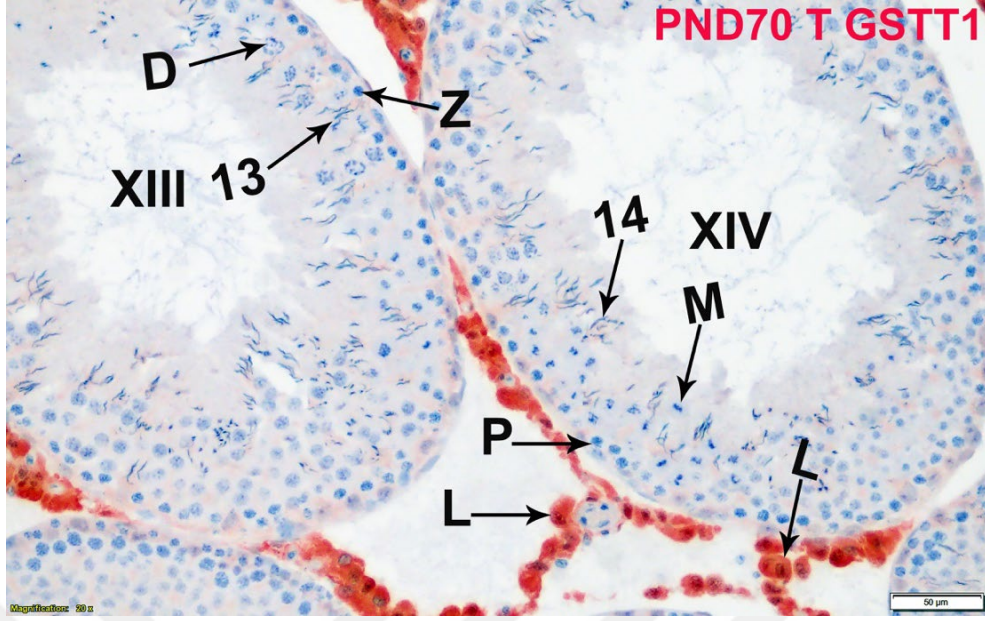
Postnatal gelişimin ileri dönemini temsil eden 70. günde testis dokusu seminifer epitelin 14 evresine göre ve spermatidlerin 19 morfolojik gelişim aşaması dikkate alınarak değerlendirildi. Germ hücre populasyonları arasında spermatogonyum, primer spermatosit (leptoten, zygoten, pakiten, diploten, diyakinez), round spermatid, elongating/elongated spermatid ve spermatozoonlar histolojik olarak ayırt edilebildi. Germ hücrelerindeki GSTT1 immünreaktivitesinin genel olarak sınırlı düzeyde olduğu gözlemlendi. Spermatogonyumlar, primer spermatositler, round spermatidler, elongating/elongated spermatidler ve spermatozoonlarda çok zayıf düzeyde boyanma saptandı (-/+). Sertoli hücrelerinde de benzer şekilde çok zayıf düzeyde sitoplazmik GSTT1 pozitifliği izlendi (-/+). Leydig hücrelerinde ise güçlü düzeyde GSTT1 immünreaktivitesi belirlendi (+++). Peritübüler myoid hücrelerde zayıf düzeyde boyanma görüldü (+). Damar duvarı düz kas tabakası, GSTT1 ifadesi bakımından negatifti (-) (Şekil 4.38-4.40). Epididimis dokusundaki GSTT1 ifadesi, epitel hücreleri düzeyinde belirgin farklılık gösterdi. Başlangıç segmenti epitelinde GSTT1 boyanması zayıf düzeyde gözlemlendi (+). Kaput epididimisteki pozitiflik orta ile güçlü düzey arasında değerlendirildi (++/+). Korpus segmentinde orta düzeyde GSTT1 ifadesi saptandı (++). Kauda segmenti epitel hücrelerinde ise yaygın ve belirgin GSTT1 pozitifliği tespit edildi (+++). Kanal duvarı, kas tabakası ve damar yapılarına ait hücrelerde GSTT1 immünreaktivitesi gözlenmedi (-) (Şekil 4.41-4.44).



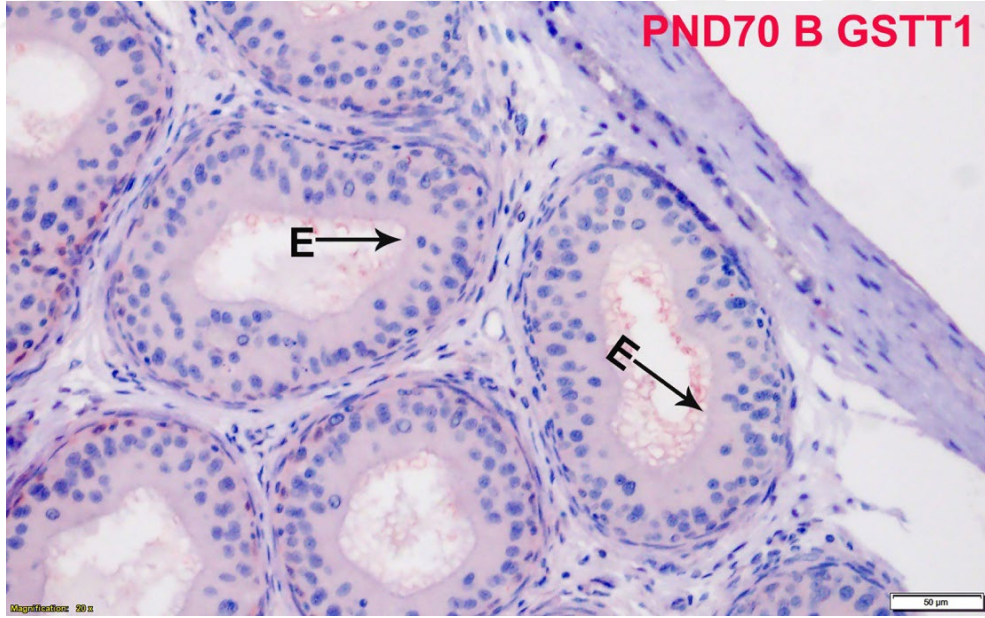
Şekil 4.38. PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelin evreleri Roma rakamlarıyla (II, IV, VIII, X, XII), spermatidlerin gelişim aşamaları ise sayılarla (2, 8, 10, 12, 17, 19) gösterilmiştir. Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Leydig hücresi (L), peritübüler myoid hücre (Ptm) ve primer spermatositlerin leptoten (Lp) ve pakiten (P) evreleri işaretlenmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



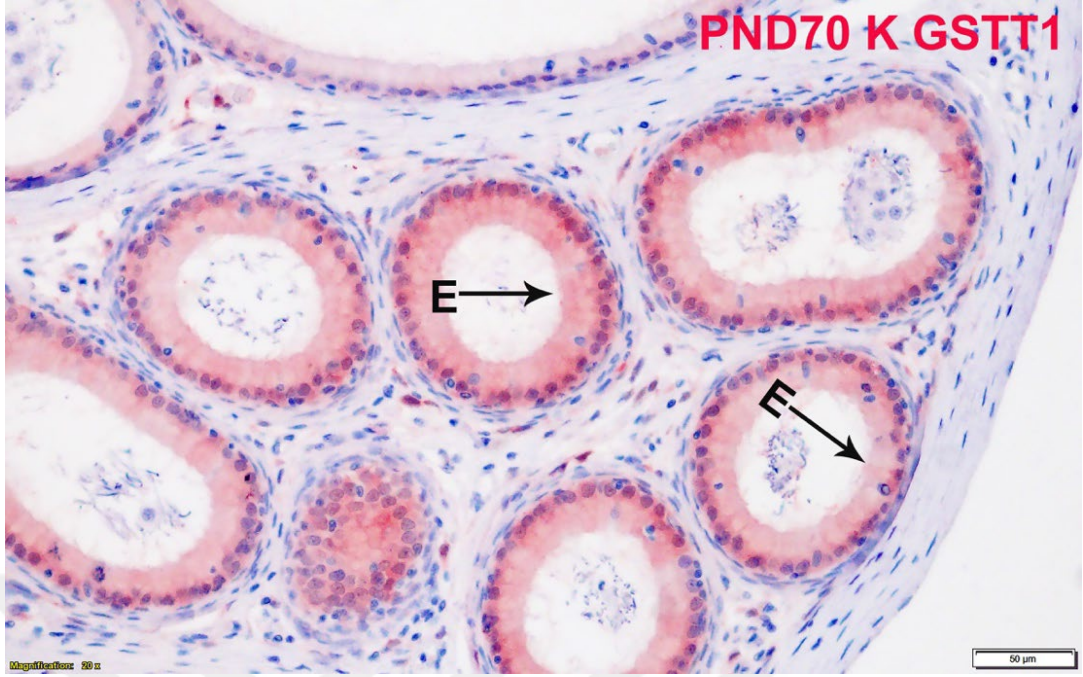
Şekil 4.39. PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelin evreleri Roma rakamlarıyla (I, II, III, VIII, XII), spermatidlerin gelişim aşamaları ise sayılarla (1, 2, 3, 8, 12, 15, 16, 19) gösterilmiştir. Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Leydig hücresi (L), peritübüler myoid hücre (Ptm) ve primer spermatositlerin leptoten (Lp) ile pakiten (P) evreleri işaretlenmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 100 µm.



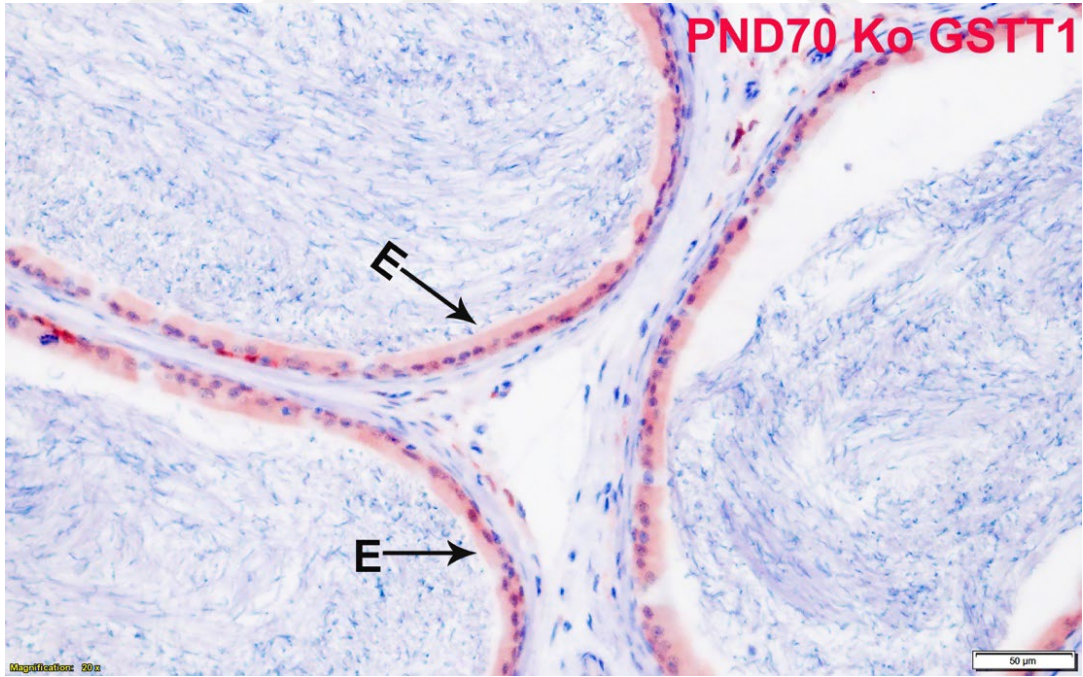
Şekil 4.40. PND70 dönemi sıçan testis dokusunda GSTT1 ifadesi. Seminifer epitelin evreleri Roma rakamlarıyla (XIII, XIV), spermatidlerin gelişim aşamaları ise sayılarla (13, 14) gösterilmiştir. Primer spermatositlerin gelişim evrelerinden zygoten (Z) ve diyakinez (D) evreleri ile mayoz bölünme aşamasındaki spermatositler (M), Leydig hücresi (L) ve pakiten evresindeki primer spermatositler (P) gösterilmiştir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



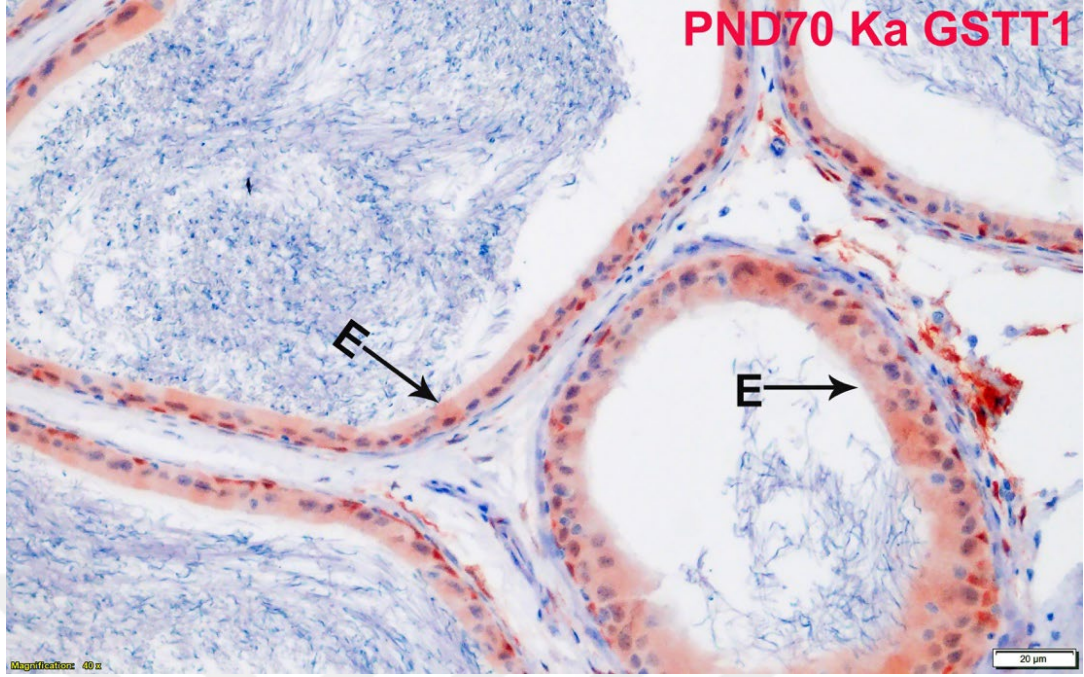
Şekil 4.41. PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun başlangıç segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) pozitiflik gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm



Şekil 4.42. PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun kaput segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) pozitiflik gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.43. PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun korpus segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) pozitiflik gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.



Şekil 4.44. PND70 dönemi sıçan epididimis dokusunun kauda segmentinde GSTT1 ifadesi. Epitel hücrelerinde (E) pozitiflik gözlenmektedir. Streptavidin-biyotin-peroksidaz, AEC. Bar: 50 µm.

PND5, PND20, PND50 ve PND70 dönemlerine ait testis ve epididimis dokularında GSTT1 immünohistokimyasal boyanma bulguları, hücre tipi ve anatomik lokalizasyona göre ayrıntılı biçimde değerlendirilmiştir. Farklı postnatal dönemlerdeki GSTT1 immünreaktivitesi, germinal hücreler, somatik destek hücreleri ve epididimis segmentleri dikkate alınarak analiz edilmiştir. Her bir hücre grubunda ve segmentte saptanan reaksiyon dereceleri semikantitatif olarak sınıflandırılmış ve bu bulgular Tablo 4.2’de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Postnatal gelişim aşamalarındaki sıçanlarda GSTT1 immün reaksiyonunun subjektif değerlendirilmesi

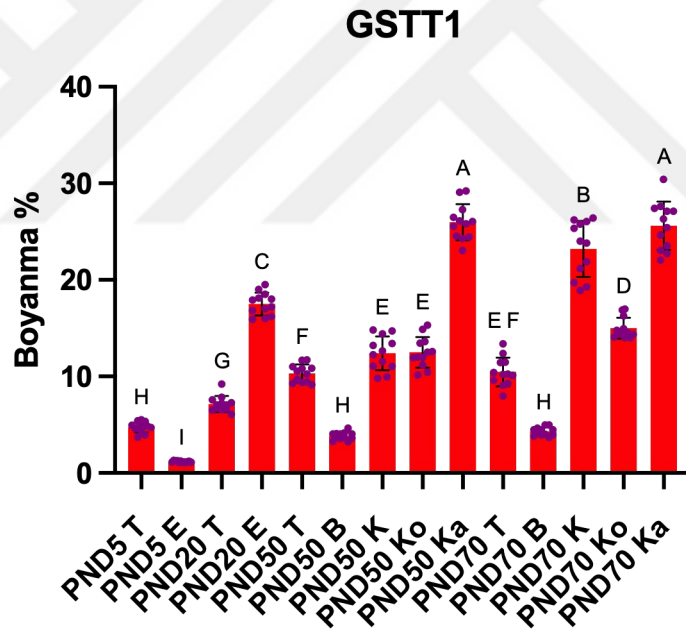
Doku	Hücre Tipi	PND5	PND20	PND50	PND70
Testis	Spermatogonyum	Gonosit -	-/+	-/+	-/+
	Spermatosit	0	-/+	-/+	-/+
	Round spermatid	0	0	-/+	-/+
	Elongating/elongated spermatid	0	0	-/+	-/+
	Spermatozoon	0	0	-/+	-/+
	Sertoli hücreleri	-	-/+	-/+	-/+
	Leydig hücreleri	+++	+++	+++	+++
	Peritubular myoid hücreler	-/+	+	+	+
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
Epididimis başlangıç segmenti	Epitel hücreleri	-/+	++	+	+
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-
Kaput epididimis	Epitel hücreleri	-/+	++	++	++/+++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-
Korpus epididimis	Epitel hücreleri	-/+	++	++	++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-
Kauda epididimis	Epitel hücreleri	-/+	++	+++	+++
	Damar duvarı kası	-	-	-	-
	Kanal duvarındaki kas katmanı	-	-	-	-

- (boyanma yok), -/+ (çok zayıf boyanma), + (zayıf boyanma), +/+ (zayıf-orta boyanma), ++ (orta boyanma), ++/+++ (orta güçlü boyanma), +++ (güçlü boyanma)

4.11. GSTT1 Kantitatif Analizi

Testis dokusunda GSTT1 boyanma oranının en yüksek olduğu grubun, postnatal 70. gün testis (PND70 T) grubu olduğu belirlendi (A). Bu grup, tüm diğer testiküler gruplardan anlamlı şekilde daha yüksek düzeyde immünreaktivite gösterdi. Bunu, postnatal 20. gün testis (PND20 T) grubu (C) ve postnatal 50. gün testis (PND50 T) grubu (F) takip etti. PND5 testis (PND5 T) grubu ise, testiküler gruplar arasında oldukça düşük bir GSTT1 immünreaktivitesi göstermekte olup (H), sadece PND5 epididimis (PND5 E) grubundan (I) anlamlı şekilde farklı bulundu. Epididimis segmentleri incelendiğinde en yüksek GSTT1 ifadesi, hem PND70 kauda (PND70 Ka) hem de PND50 kauda (PND50 Ka) gruplarında gözlemlendi (A). Bu iki grup, diğer epididimis segmentlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulundu. PND70 kaput (PND70 K) grubu ise ifade açısından ikinci sırada yer almakta olup (B), kauda

segmentlerinden daha düşük düzeyde boyanma gösterdi. PND50 kaput (PND50 K), PND50 korpus (PND50 Ko) ve PND70 korpus (PND70 Ko) grupları benzer ifade düzeylerine sahip olup (E), PND70 Ka/PND50 Ka ve PND70 K gruplarından istatistiksel olarak düşük düzeyde yer aldı. PND50 başlangıç (PND50 B) ve PND70 başlangıç (PND70 B) grupları da (E–F) harf gruplarında bulundu. İfade düzeyi açısından düşük, fakat kauda ve kaput segmentlerinden anlamlı şekilde farklı bulundu. PND20 epididimis (PND20 E) ve PND50 testis (PND50 T) grupları orta-düşük düzeyde GSTT1 ifadesi gösterdi (F). PND5 başlangıç segmenti (PND5 B) ve PND5 epididimis (PND5 E) grupları ise en düşük boyanma yüzdelere sahip gruplar olarak değerlendirildi (H–I). Epididimis segmentleri arasında yaşa bağlı olarak özellikle kauda ve kaput bölgelerinde belirgin artış izlendi. PND70 döneminde kauda segmenti, tüm testis ve epididimis grupları içinde en yüksek düzeye ulaştı (A) (Şekil 45).



Şekil 4.45. GSTT1 immünreaktivitesine ilişkin kantitatif analiz sonuçları. Postnatal gün 5, 20, 50 ve 70’e ait testis (T), epididimis başlangıç (B), kaput (K), korpus (Ko) ve kauda (Ka) bölgelerinde GSTT1 immünboyanma yüzdesi değerlendirilmiştir. Boyanma oranları ImageJ yazılımında “Color Deconvolution” eklentisiyle analiz edilmiş; her hayvandan elde edilen, aynı büyütmeye çekilmiş toplam 12 görüntü üzerinden ölçüm gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiş, istatistiksel olarak anlamlı gruplar harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada GSTK1 ve GSTT1 izoformlarının testis ve epididimis dokularındaki postnatal gelişim süreci boyunca hücresel ve segmental düzeydeki ifade paternleri değerlendirilmiştir. PND5, PND20, PND50 ve PND70 dönemlerinden elde edilen veriler, her iki enzimin de gelişimsel süreçte zamana bağlı olarak farklı yoğunluklarda ifade edildiğini ve bu değişimlerin hücre tipleri ile anatomik segmentler arasında belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, GSTK1 ve GSTT1'in ifade düzeylerindeki değişimlerin, postnatal gelişim sürecinde testis ve epididimis dokularının farklı işlevsel gereksinimlerine uyum sağlayacak şekilde düzenlendiğini düşündürmektedir.

Zeng ve ark. (2022) tarafından erişkin erkek domuzlarda gerçekleştirilen çalışmada, GSTK1'in testis içindeki hücresel dağılımı ve işlevsel ilişkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. İmmünohistokimyasal analizlerde GSTK1'in özellikle Leydig ve Sertoli hücrelerinde yoğun şekilde ifade edildiği belirlenmiş olup, bu dağılımın steroidogeneze görev alan Leydig hücreleri ile germ hücre gelişiminde kritik parakrin destek sağlayan Sertoli hücrelerinde redoks homeostazının korunmasında önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Western blot sonuçları, bu hücrelerdeki GSTK1 bolluğunu doğrulamış ve sperm motilitesi ile anlamlı pozitif korelasyon bulunduğunu ortaya koymuştur. Düşük motiliteye sahip spermelerde GSTK1 seviyelerinin belirgin olarak azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca kapasitasyon sonrası sperm akrozomunda GSTK1 varlığı tespit edilmiştir. Anti-GSTK1 antikorlarıyla yapılan blokaj deneylerinde fertilizasyon oranında anlamlı azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, sperm işlevsel bütünlüğü üzerinde enzimin doğrudan etkili olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda Leydig ve Sertoli hücrelerinde GSTK1 pozitifliği saptanmış olmakla birlikte, Zeng ve ark. (2022)'nın bildirdiği kadar yoğun bir boyanma paterni izlenmemiştir. Bu hücrelerdeki immünreaktivitenin çalışmamızda daha düşük düzeyde olması, türler arası biyolojik farklılıklar, antikorların epitope özgüllüğü, doku işleme ve boyama protokollerindeki teknik değişkenlikler veya testis fizyolojisindeki metabolik taleplerin farklılığı ile açıklanabilir. Buna rağmen PND70 döneminde bu hücrelerde görülen pozitiflik, GSTK1'in steroidogeneze sürecinde ortaya çıkabilecek

reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu ve germ hücrelerinin oksidatif hasardan korunması açısından anlamlı olduğunu göstermektedir. Sertoli hücrelerinde saptanan sınırlı GSTK1 ifadesi, germ hücre gelişiminde redoks dengenin korunmasına yönelik bir destek mekanizmasının varlığını işaret ederken, Leydig hücrelerindeki düşük düzeyli GSTK1 varlığı, steroid sentezinin yan ürünleri olan ROS'un etkisizleştirilmesinde rol oynayabilecek potansiyel bir işlevin varlığına işaret etmektedir. Dolayısıyla, Zeng ve ark. (2022)'nin bulguları ile çalışmamız arasındaki en belirgin fark, Leydig ve Sertoli hücrelerindeki boyanma yoğunluğu olsa da, her iki çalışmada da bu hücre tiplerinde GSTK1 varlığı doğrulanmıştır. Bu bulgu, testiküler redoks homeostazının korunmasında GSTK1'in germ ve destek hücreleri arasında eşgüdümlü bir rol üstlendiği yönündeki görüşü desteklemektedir.

An ve ark. (2025) tarafından yürütülen çalışmada mevsimsel üreyen kemirgen türü olan *Eospalax baileyi*'de androjen blokajı ile (flutamid uygulanarak) testiküler regresyon modeli oluşturulmuştur. Bu model üreme sezonu dışında doğal olarak meydana gelen testis küçülmesini taklit edecek şekilde planlanmış ve androjen düzeylerindeki düşüşün testis dokusu üzerindeki moleküler etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Araştırmacılar, regresyon sürecinde glutatyon metabolizması ile ilişkili genlerin ifade profillerini kapsamlı biçimde analiz etmiş ve bu genler arasında GSTK1'in anlamlı düzeyde yukarı regüle olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma, androjen düzeylerinin baskılanmasının testis dokusunda oksidatif stres riskini artırdığını ve bu durum karşısında antioksidan savunma sistemi bileşenlerinden biri olan GSTK1'in koruyucu bir yanıt olarak devreye girdiğini ortaya koymaktadır. Araştırmacılar hormon seviyesindeki azalmanın yarattığı redoks dengesizliğini telafi etmek üzere GSTK1 ifadesini arttığını ve bu artışın doku bütünlüğünün korunması ile germ hücre sağkalımının desteklenmesi açısından adaptif bir yanıt olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca androjen baskılanmasının mitokondriyal işlevler ve lipid metabolizması üzerinde oluşturduğu baskı dikkate alındığında GSTK1'in peroksizomal ve mitokondriyal düzeyde oksidatif metabolizmayı dengeleyerek ferroptosis gibi hücre ölüm mekanizmalarını sınırlayabileceği öne sürülmüştür. Çalışmamız ise farklı bir endokrin bağlamda yani puberte sonrası dönemde fizyolojik testosteron artışı koşullarında GSTK1 ifadesini değerlendirmiştir. PND50 ve özellikle

PND70 dönemlerinde primer spermatositler başta olmak üzere germ hücre hattında GSTK1 ifadesinin belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Modelimizdeki GSTK1 ifadesinde gözlenen artış, androjen düzeylerinin yükseldiği bir dönemde spermatogenezin hızlanması ve metabolik oksidatif yükün artması ile ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla An ve ark.'nın (2025) hormon azalmasına karşı gözlemlendiği GSTK1 artışı ile çalışmamızda hormon artışı eşliğinde saptadığımız GSTK1 artışı farklı fizyolojik koşullara ait olsa da benzer bir biyolojik amaca yani germ hücrelerin oksidatif stres karşısında korunmasına hizmet eden adaptif yanıtlar olarak değerlendirilebilir.

Blackburn ve ark. (2011) tarafından yürütülen çalışmada *Mus musculus* modelinde GSTK1 geni hedeflenerek işlev kaybı (knockout) oluşturulmuş ve bu eksikliğin farklı organlardaki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Araştırmacılar, GSTK1 eksik fareler ile normal genotipli fareleri değerlendirdiklerinde üreme işlevlerinde belirgin bir bozukluk saptamamışlardır. Bununla birlikte, doku dağılım analizleri normal genotipli farelerde testisin GSTK1 açısından en yüksek ifade seviyelerinden birine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, testisin oksidatif dengeyi koruma kapasitesinde GSTK1'in sürekli aktif tutulduğunu ve fizyolojik koşullarda önemli bir antioksidan işlev üstlendiğini göstermektedir. Üreme işlevinde belirgin bir kayıp gözlenmemesi, GSTK1 eksikliğinde diğer glutatyon S-transferaz izoformlarının veya farklı antioksidan savunma yollarının devreye girerek telafi sağladığını düşündürmektedir. Ancak bu olası telafi mekanizmaları, normal koşullarda yüksek GSTK1 düzeylerinin korunmasının biyolojik gerekliliğini ortadan kaldırmamaktadır. Çalışmamızda PND70 döneminde hem germ hücrelerinde hem de Sertoli ve Leydig hücreleri gibi destek hücrelerinde belirgin GSTK1 pozitifliği saptanmıştır. Bu bulgular, Blackburn ve ark. (2011)'nın normal genotipli farelerde tanımladığı yüksek ifade düzeyleri ile uyumlu olup, GSTK1'in olgun testiste oksidatif stresin sınırlandırılması, hücre bütünlüğünün korunması ve spermatogenezin sürekliliğinin sağlanmasında temel bir moleküler bileşen olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Ayrıca verilerimiz, GSTK1'in yalnızca bazal seviyede değil, gelişimsel ilerleme ile birlikte artan metabolik ve redoks taleplere yanıt olarak da

yüksek düzeylerde tutulduğunu ortaya koymaktadır ve bu yönüyle normal gelişim koşullarında dahi kritik rol oynadığını vurgulamaktadır.

Souza ve ark. (2021) tarafından yürütülen çalışmada gebelik sürecinde arsenik maruziyetine uğrayan sıçanların erkek yavrularında prepubertal dönemde testis ve epididimis dokularında antioksidan yanıt profili değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, prenatal arsenik maruziyetinin postnatal 42. günde GSTK1 dahil olmak üzere SOD1, SOD2 ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin gen ifade düzeylerini anlamlı biçimde artırdığını ortaya koymuşlardır. Bu artış, epididimal GST aktivitesindeki yükselme ve oksidatif hasar belirteçlerindeki artışla birlikte görülmüştür. Çalışmada elde edilen bulgular, prenatal dönemdeki toksik maruziyetin henüz erginliğe ulaşmamış bireylerde redoks homeostazını yeniden programlayarak oksidatif strese karşı koruyucu adaptif yanıtları tetikleyebileceğini göstermektedir. Çalışmamızla karşılaştırıldığında Souza ve ark. (2021)'nin modelinde GSTK1 artışı patolojik bir çevresel stres faktörüne yanıt olarak ortaya çıkarken; modelimizdeki artış, fizyolojik postnatal gelişim ve puberte sonrası hormonal olgunlaşma sürecinde gözlenmiştir. Her iki durumda da GSTK1 düzeylerindeki yükselme, germ hücrelerin oksidatif hasardan korunmasına hizmet eden ortak bir biyolojik mekanizmanın devreye girdiğini göstermektedir. Bu benzerlik, GSTK1'in hem fizyolojik hem de stres koşullarında redoks dengesinin korunmasında stratejik bir konumda olduğunu düşündürmektedir.

Gandy ve ark. (1996), sıçan epididimisinde toplam glutatyon S-transferaz aktivitesini segmentler bazında değerlendirmiş ve caput bölgesinde en yüksek, corpus ve kauda bölgelerine doğru kademeli olarak azalan bir profil bildirmiştir. Çalışmada izoform ayrımı yapılmamış olması nedeniyle GSTK1'e özgü veri sağlanmamış, ancak antioksidan kapasitenin anatomik bölgelere göre farklılık gösterebildiği ortaya konmuştur. Souza ve ark. (2021), prenatal arsenik maruziyeti modelinde postnatal 42. günde epididimis epitelinde GSTK1, SOD1, SOD2 ve katalaz gibi antioksidan genlerin anlamlı şekilde yukarı regüle olduğunu, epididimal GST aktivitesinde artış ve oksidatif hasar belirteçlerinde yükselme görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu bulgular, gelişimsel dönemde toksik etkilere karşı GSTK1'in adaptif yanıt olarak devreye girdiğini göstermektedir. Zeng ve ark. (2022) erişkin domuzlarda spermatozoada GSTK1 varlığını doğrulamış, kapasitasyon sonrası akrozomal lokalizasyonunu

göstermiş, anti-GSTK1 antikorları ile yapılan blokaj sonrası fertilizasyon oranlarının düştüğünü ve GSTK1 düzeyi ile sperm kalitesi arasında pozitif ilişki bulunduğunu bildirmiştir. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde GSTK1'in epididimis dokusunda segmental dağılım gösterebildiği (Gandy ve ark., 1996), çevresel stres faktörlerine karşı güçlü bir şekilde yanıt verebildiği (Souza ve ark., 2021) ve spermin işlevsel bütünlüğünde kritik rol üstlenebildiği (Zeng ve ark., 2022) anlaşılmaktadır. Çalışmamızda PND5–PND70 dönemleri arasında epididimis epitelindeki GSTK1 ifadesi, segment ve zaman düzleminde haritalanmış, PND50'de kaput ve korpusta başlayan artışın PND70'te kauda segmentinde en yüksek seviyeye ulaştığı gösterilmiştir. Bu patern, olgun spermin depolandığı kauda bölgesinde artan oksidatif yükün kontrolüne yönelik fizyolojik bir adaptasyon olarak yorumlanmaktadır. Gandy ve ark. (1996) tarafından bildirilen caput merkezli toplam GST aktivitesi profili ile kauda merkezli GSTK1 immünifade haritamız arasındaki farklılık, hem metodolojik yaklaşım farkını (toplam aktivite ölçümü yerine izoform-özel immünohistokimya) hem de segmentlerin işlevsel rollerini yansıtmaktadır. Souza ve ark. (2021) modelindeki yaygın artış ile fizyolojik modelimizdeki segmental artış farklı tetikleyicilere yanıt olarak ortaya çıkmış olsa da ortak biyolojik hedef spermatozoaların oksidatif hasara karşı korunması olduğu açıktır. Zeng ve ark. (2022) tarafından sperm düzeyinde gösterilen kalite ve fertilizasyon ilişkisi, kauda segmentinde saptanan yüksek GSTK1 ifadesinin işlevsel önemini desteklemekte ve epididimis haritalamamızın biyolojik geçerliliğini güçlendirmektedir.

Knight ve ark. (2007), C57BL/6 farelerde 19 farklı glutatyon S-transferaz (GST) izoformunun bazal mRNA profillerini sistematik olarak analiz etmiş, erkek ve dişi bireylerden alınan çok sayıda doku örneğinde total RNA izolasyonu ve izoform-spesifik kantitatif PCR uygulamış, referans genlerle normalize edilen sonuçlarda GSTT1 dahil birçok GST geninin gonadlarda anlamlı düzeylerde ifade edildiğini ortaya koymuştur. Çalışma, hücresel lokalizasyon veya gelişimsel patern bilgisi sunmamış ancak cinsiyetler arası karşılaştırmalarda bazı izoformların dişi gonadlarda erkek gonadlara kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edildiğini rapor ederek GSTT1'in hormon düzeylerinden ve cinsiyete özgü endokrin mikroçevreden etkilenebileceğini düşündürmüştür. Saadat ve ark. (2010), düşük frekanslı elektromanyetik alan (50 Hz,

500 μ T) maruziyetinin rat testisinde GSTT1 ifadesine etkisini araştırmıştır. Çalışmada erişkin erkek Wistar sıçanlar, 30 gün boyunca günde 8 saat manyetik alana maruz bırakmış ve RT-PCR analizlerinde kontrol ile maruziyet grupları arasında anlamlı fark bulunmadığını belirleyerek GSTT1'in bazı çevresel stres faktörlerine karşı stabil bir ifade paternine sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Wu ve ark. (2013)'nın hem geniş ölçekli bir vaka-kontrol çalışması (n=2371) hem de meta-analiz (19 çalışma, toplam 6934 birey) çalışması, GSTT1 ve GSTM1 null polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisini incelemiş, GSTT1 null genotipinin genel popülasyonda anlamlı risk artışı göstermediğini ancak Asya kökenli alt grupta infertilite riskinin belirgin düzeyde arttığını saptamıştır. Ayrıca işlevsel GSTT1 genotipine sahip bireylerde GSTT1 düzeylerinin null genotiplilere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu ve bunun sperm işlevlerinin korunmasında, oksidatif stresin sınırlandırılmasında rol oynayabileceğini vurgulamıştır. Zhang ve ark. (2024) ise 568 erkekten elde edilen semen örneklerinde GSTT1 genotipini PCR ile belirlemiş, sperm mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısını kantitatif PCR ile ölçmüş ve CASA sistemi ile sperm motilitesini değerlendirmiştir. İşlevsel GSTT1 varlığında total ve progresif motilitenin daha yüksek olduğu, oksidatif stres koşullarında motilite kaybının daha az belirgin olduğu, GSTT1-null genotipinde ise bu koruyucu etkinin ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Bu literatür bulgularıyla birlikte değerlendirildiğinde çalışmamız, postnatal gelişimin tüm dönemlerinde (PND5, PND20, PND50, PND70) germ hücre serilerinde (spermatogonyum, primer spermatosit, round spermatid, elongating/elongated spermatid, spermatozoon) GSTT1 ifadesinin çok zayıf düzeylerde kaldığını, Sertoli hücrelerinde düşük düzeyli reaksiyon görüldüğünü, buna karşılık Leydig hücrelerinde PND5'ten itibaren güçlü pozitifliğin tüm dönem boyunca korunduğunu ortaya koymuştur. Peritübüler myoid hücrelerde düşük-orta düzeyde pozitiflik saptanması ise enzimin testiküler mikroçevrede yapısal ve parakrin destek mekanizmalarına katkı sağladığını düşündürmektedir. Bu hücresel dağılım, Wu ve Zhang'ın işlevsel GSTT1 varlığının sperm işlevlerini koruduğu ve null genotipin infertilite riskini artırdığı yönündeki bulgularını desteklemektedir. Knight ve Saadat'ın sonuçları ile uyumlu olarak GSTT1'in germ hücrelerine-özü bir enzimden ziyade somatik hücre aracılı redoks kontrolünde görev aldığını ve dolaylı olarak sperm kalitesini desteklediğini göstermektedir.

Epididimis dokusunda GSTT1 ifadesine ilişkin mevcut literatür incelendiğinde izoform-özgü doğrudan veri sağlayan çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Çoğu araştırma, toplam GST aktivitesine veya Alpha, Mu ve Pi sınıfı izoformlara odaklanmakta, theta sınıfı ve özellikle GSTT1 büyük ölçüde değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Gandy ve ark. (1996), Western blot ve HPLC teknikleriyle sıçan epididimisinde toplam GST protein düzeyi ve aktivitesinin kaput segmentinde en yüksek, korpus ve kaudada ise giderek azalan bir profil sergilediğini bildirmişlerdir. Ancak bu ölçümler, izoform ayrımı yapılmadan gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, Jervis ve Robaire (2001) mikroyarray analizleri ile GST-Pi transkriptinin proksimal segmentlerden distale azaldığını ortaya koymuş ve kaput ağırlıklı antioksidan aktivite modelini desteklemiştir. Montiel ve ark. (2003) ise insan epididimisinden izole edilen hücre kültürlerinde toplam GST aktivitesinin kauda kaynaklı hücrelerde daha yüksek olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışma tür, metodoloji ve hedef izoform farklılıklarının segmental antioksidan profili doğrudan etkileyebileceğini göstermiştir. GSTT1'e özgü doğrudan kanıtlar ise daha çok genotip düzeyinde elde edilmiştir. Wu ve ark. (2013) GSTT1-null genotipin Asya popülasyonunda infertilite riskini artırabileceğini; Zhang ve ark. (2024) ise işlevsel GSTT1 varlığında epididimal olgunlaşmasını tamamlamış spermatozoalarda motilitenin daha yüksek ve oksidatif stres altında motilite kaybının daha az olduğunu göstermiştir. Bu veriler, GSTT1'in epididimal sperm işlevlerinin korunmasında potansiyel bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bu literatür çerçevesinde değerlendirildiğinde, çalışmamızda postnatal gelişim boyunca epididimis epitelinde GSTT1 ifadesinin segmental ve zamansal olarak belirgin bir düzenlenme gösterdiği saptanmıştır. PND5'te tüm segmentlerde çok zayıf düzeyde ifade bulunurken, PND20'de tüm segmentlerde orta düzeyde ve yaygın sitoplazmik boyanma izlenmiştir. PND50'de segmentler arası belirgin farklılık ortaya çıkmış; başlangıç segmentinde zayıf, kaput ve korpusta orta, kaudada ise güçlü ifade tespit edilmiştir. PND70'te bu desen korunarak olgunlaşmış ve kauda segmentinde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Tüm dönemlerde kanal duvarı kas tabakası ve damar yapılarında GSTT1 ifadesinin olmaması, enzimin epitel hücrelerine özgü olduğunu göstermektedir. Erişkin dönemde kaudada saptanan yüksek GSTT1 düzeyi, Montiel ve ark. (2003)'ün insan kauda epididimisinde yüksek hücre içi GST aktivite bulgusu ile uyum

göstermektedir. Buna karşın, Gandy ve Jervis'in kaput ağırlıklı paternleri ile gözlenen farklılık, GSTT1'in diğer GST sınıflarından bağımsız, sınıfa-özü bir dağılım sergileyerek kauda segmentinde uzun süreli depolama koşullarında oksidatif stresin sınırlandırılmasına yönelik özgün bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, GSTT1'in epididimal antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olduğunu ve özellikle sperm depolama sürecinde işlevsel bütünlüğün korunmasında kritik bir görev üstlenebileceğini ortaya koymaktadır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular, GSTK1 ve GSTT1'in testis ve epididimis dokularında postnatal gelişime bağlı olarak hem zamansal hem de segmental düzeyde belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. GSTK1, testiste puberte sonrası dönemde özellikle primer spermatositler ve ileri evre germ hücrelerinde artış gösterirken, epididimis dokusunda PND50'den itibaren kaput ve korpusta başlayan yükselişin PND70'te kauda segmentinde en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bu segmental ifade biçimi, kauda epididimisin olgun sperm depolama bölgesi olarak artan oksidatif yükü dengeleme gereksinimi ile uyumlu görülmektedir. GSTT1 ise testiste tüm gelişim evrelerinde Leydig hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilerek steroidogenezle ilişkili redoks kontrolüne katkıda bulunmuş, epididimis dokusunda ise PND20'den itibaren tüm segmentlerde benzer düzeyde gözlenmiş ancak erişkin dönemde kauda segmentinde belirginleşmiştir. Segmentler arası bu farklılıklar, epididimis boyunca değişen fizyolojik rollerin izoform düzeyinde yansımaları olarak değerlendirilebilir. Her iki enzimin de belirgin şekilde epitel hücrelerine özgü lokalizasyon göstermesi, epididimal olgunlaşma sürecinde doğrudan spermatozoalarla temas eden hücrelerde redoks dengesinin sağlanmasında stratejik bir görev üstlendiğini göstermektedir. Literatürde postnatal gelişim sürecinde bu izoformların birlikte, hücresel ve segmental bağlamda haritalandığı başka bir çalışma bulunmaması, elde edilen verilerin hem temel üreme biyolojisi hem de klinik androloji açısından önemli bir referans niteliğinde olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar ışığında, ilerleyen araştırmalarda GSTK1 ve GSTT1'in farklı çevresel stres koşulları, hormonal değişimler ve yaşlanma süreçleri altındaki ifade dinamiklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, bu enzimlerin üreme sağlığındaki rollerinin daha kapsamlı anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal A, Parekh N, Selvam MKP, Henkel R, Shah R, Homa ST, Ramasamy R, Ko E, Tremellen K, Esteves S, Majzoub A, Alvarez JG, Gardner DK, Jayasena CN, Ramsay JW, Cho CL, Saleh R, Sakkas D, Hotaling JM, Harlev A (2019). Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J. Mens Health*, **37(3)**, 296-312.

Aire TA (1980). The cycle of the seminiferous epithelium of the domesticated giant rat (*Cricetomys gambianus* Waterhouse). *Acta Anat.*, **108(2)**, 160-168.

An K, Tan Y, Yang K, Kang Y, Liu P, Hao B, Su J (2025). Androgen-induced ferroptosis regulates seasonal testicular regression: insights into adaptive mechanisms of seasonal breeding. *BMC Genomics*, **26(1)**, 644.

Aravinda S, Gopalakrishnan B, Dey CS, Totey SM, Pawshe CH, Salunke D, Kaur K, Shaha C (1995). A testicular protein important for fertility has glutathione S-transferase activity and is localized extracellularly in the seminiferous tubules. *J. Biol. Chem.*, **270(26)**, 15675-15685.

Ardestani A, Yazdanparast R (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.*, **104(1)**, 21-29.

Ayad B, Omolaoye TS, Louw N, Ramsunder Y, Skosana BT, Oyeipo PI, Du Plessis SS (2022). Oxidative stress and male infertility: evidence from a research perspective. *Front. Reprod. Health*, **4**, 822257.

Barati E, Nikzad H, Karimian M (2020). Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell. Mol. Life Sci.*, **77(1)**, 93-113.

Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP, Jarvi KA (2011). Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J. Proteome Res.*, **10(3)**, 941-953.

Bergmann M, Dierichs R (1983). Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. *Anat. Embryol.*, **168(2)**, 269-275.

Blackburn AC, Coggan M, Shield AJ, Cappello J, Theodoratos A, Murray TP, Koina ME, Dahlstrom JE, Matthaei KI, Board PG (2011). Glutathione transferase kappa deficiency causes glomerular nephropathy without overt oxidative stress. *Lab. Invest.*, **91(11)**, 1572-1583.

Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet

JR, Vernet P (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.*, **119**(7), 2074-2085.

Chen H, Ge RS, Zirkin BR (2009). Leydig cells: from stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **306**(1-2), 9-16.

Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA (1996). Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet*, **347**(8997), 295-297.

Collin F (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(10), 2407.

Costa CF, Lismont C, Chorny S, Li H, Hussein MAF, Waterham HR, Fransen M (2023). Functional analysis of GSTK1 in peroxisomal redox homeostasis in HEK-293 cells. *Antioxidants*, **12**(6), 1236.

Dacheux JL, Belleannée C, Jones R, Labas V, Belghazi M, Guyonnet B, Druart X, Gatti JL, Dacheux F (2009). Mammalian epididymal proteome. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **306**(1-2), 45-50.

Dorostghoal M, Sorooshnia F, Zardkaf A (2011). Stereological analysis of Wistar rat testis during early post-natal development. *Anat. Histol. Embryol.*, **40**(2), 89-94.

Fafula RV, Paranyak NM, Besedina AS, Vorobets DZ, Iefremova UP, Onufrovych OK, Vorobets ZD (2019). Biological significance of glutathione S-transferases in human sperm cells. *J. Hum. Reprod. Sci.*, **12**(1), 24-28.

Ferreira MJ, Rodrigues TA, Pedrosa AG, Silva AR, Vilarinho BG, Francisco T, Azevedo JE (2023). Glutathione and peroxisome redox homeostasis. *Redox Biol.*, **67**, 102917.

Fulcher KD, Welch JE, Klapper DG, O'Brien DA, Eddy EM (1995). Identification of a unique μ -class glutathione S-transferase in mouse spermatogenic cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **42**(4), 415-424.

Gandy J, Primiano T, Novak RF, Kelce WR, York JL (1996). Differential expression of glutathione S-transferase isoforms in compartments of the testis and segments of the epididymis of the rat. *Drug Metab. Dispos.*, **24**(7), 725-733.

Gerber J, Heinrich J, Brehm R (2016). Blood-testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice. *Reproduction*, **151**(2), R15-R27.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**(11), 1106-1114.

Gram DY, Sexton B, Liman N, Müller L, Abay M, Gram A, Balogh O (2022). Testicular expression of antioxidant enzymes and changes in response to a slow-release deslorelin implant (Suprelorin® 4.7 mg) in the dog. *Animals*, **12**(18), 2343.

Hess RA (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol. Reprod.*, **43(3)**, 525-542.

Hong Y, Boiti A, Vallone D, Foulkes NS (2024). Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants*, **13(3)**, 312.

Ichioaka K, Nagahama K, Okubo K, Soda T, Ogawa O, Nishiyama H (2009). Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase T1 affect the surgical outcome of varicocelectomies in infertile patients. *Asian J. Androl.*, **11(3)**, 333-341.

Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R (2013). INSL3 as a biomarker of leydig cell functionality. *Biol. Reprod.*, **88(6)**, 147.

Jaiswal D, Sah R, Agrawal NK, Dwivedi US, Trivedi S, Singh K (2012). Combined effect of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms on human male infertility in North Indian population. *Reprod. Sci.*, **19(3)**, 312-316.

Jervis KM, Robaire B (2001). Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, **65(3)**, 696-703.

Kaltsas A (2023). Oxidative stress and male infertility: the protective role of antioxidants. *Medicina (Kaunas)*, **59(10)**, 1769.

Katoh T, Inatomi H, Kim H, Yang M, Matsumoto T, Kawamoto T (1998). Effects of glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 genotypes on urothelial cancer risk. *Cancer Lett.*, **132(1-2)**, 147-152.

Kerr JB, Knell CM (1988). The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development*, **103(3)**, 535-544.

Klys HS, Whillis D, Howard G, Harrison DJ (1992). Glutathione S-transferase expression in the human testis and testicular germ cell neoplasia. *Br. J. Cancer*, **66(3)**, 589-593.

Knight TR, Choudhuri S, Klaassen CD (2007). Constitutive mRNA expression of various glutathione S-transferase isoforms in different tissues of mice. *Toxicol. Sci.*, **100(2)**, 513-524.

Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **55(4)**, 548-573.

Lee D, Moawad AR, Morielli T, Fernandez MC, O'Flaherty C (2017). Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.*, **23(2)**, 106-115.

Li J, Liu F, Wang H, Liu X, Liu J, Li N, Wan F, Wang W, Zhang C, Jin S, Liu J, Zhu P, Liu Y (2010). Systematic mapping and functional analysis of a family of

human epididymal secretory sperm-located proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **9**(11), 2517-2528.

Llavanera M, Mateo-Otero Y, Bonet S, Barranco I, Fernández-Fuertes B, Yeste M (2020). The triple role of glutathione S-transferases in mammalian male fertility. *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**(12), 2331-2342.

Malkov M, Fisher Y, Don J (1998). Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, **59**(1), 84-92.

Mannucci A, Argento FR, Fini E, Coccia ME, Taddei N, Becatti M, Fiorillo C (2022). The impact of oxidative stress in male infertility. *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 799294.

Marks JL, McMahon R, Lipshultz LI (1986). Predictive parameters of successful varicocele repair. *J. Urol.*, **136**(3), 609-612.

Miguel-Jiménez S, Pina-Beltrán B, Gimeno-Martos S, Carvajal-Serna M, Casao A, Pérez-Pe R (2021). NADPH oxidase 5 and melatonin: involvement in ram sperm capacitation. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 655794.

Montiel EE, Huidobro CC, Castellon EA (2003). Glutathione-related enzymes in cell cultures from different regions of human epididymis. *Arch. Androl.*, **49**(2), 95-105.

Mukherjee SB, Aravinda S, Gopalakrishnan B, Nagpal S, Salunke DM, Shaha C (1999). Secretion of glutathione S-transferase isoforms in the seminiferous tubular fluid, tissue distribution and sex steroid binding by rat GSTM1. *Biochem. J.*, **340**(Pt 2), 309-318.

Mukhtar H, Lee IP, Bend JR (1978). Glutathione S-transferase activities in rat and mouse sperm and human semen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**(3), 1093-1098.

Nascimento AR, Macheroni C, Lucas TFG, Porto CS, Lazari MFM (2016). Crosstalk between FSH and relaxin at the end of the proliferative stage of rat Sertoli cells. *Reproduction*, **152**(6), 613-628.

O'Flaherty C (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, **7**(5), 662-668.

Okubo K, Nagahama K, Kamoto T, Okuno H, Ogawa O, Nishiyama H (2005). GSTT1 and GSTM1 polymorphisms are associated with improvement in seminal findings after varicocelectomy. *Fertil. Steril.*, **83**(5), 1579-1580.

Özbek M, Beyaz F, Hitit M, Öztıp M, Karaca H, Ergün E, Cabir A, Ergün L (2025). Spatiotemporal expression patterns of vascular endothelial growth factor and receptors in rat testis and epididymis throughout postnatal development. *Bratisl. Med. J.*, 1-17.

Papp S, Robaire B, Hermo L (1995). Immunocytochemical localization of the Ya, Yc, Yb1, and Yb2 subunits of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of adult rats. *Microsc. Res. Tech.*, **30(1)**, 1-23.

Paz M, Morín M, del Mazo J (2006). Proteome profile changes during mouse testis development. *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteomics*, **1(4)**, 404-415.

Picut CA, Remick AK, de Rijk EP, Simons ML, Stump DG, Parker GA (2015). Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol. Pathol.*, **43(3)**, 326-342.

Picut CA, Ziejewski MK, Stanislaus D (2018). Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system. *Birth Defects Res.*, **110(3)**, 190-227.

Raza H (2011). Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J.*, **278(22)**, 4243-4251.

Saadat I, Sedaghat Z, Afhami M, Bahaoddini A, Saadat M (2010). Effect of a 50-Hz electromagnetic field on the gene expression of glutathione S-transferase T1 (Gstt1) in the testis and liver of male rats. *Comp. Clin. Pathol.*, **19(2)**, 211-214.

Salinas AE, Wong MG (1999). Glutathione S-transferases--a review. *Curr. Med. Chem.*, **6(4)**, 279-309.

Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.*, **6(2)**, 289-300.

Shima Y (2022). Functional importance of mini-puberty in spermatogenic stem cell formation. *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 907989.

Shu P, Liang H, Zhang J, Lin Y, Chen W, Zhang D (2023). Reactive oxygen species formation and its effect on CD4+ T cell-mediated inflammation. *Front. Immunol.*, **14**, 1199233.

Souza ACF, Machado-Neves M, Bastos DSS, Santos FC, Ervilha LOG, de Paiva Coimbra JL, Guimarães SEF (2021). Impact of prenatal arsenic exposure on the testes and epididymides of prepubertal rats. *Chem. Biol. Interact.*, **333**, 109314.

Veri JP, Hermo L, Robaire B (1994). Immunocytochemical localization of glutathione S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis. *J. Androl.*, **15(5)**, 415-434.

Wang L, Groves JM, Hepburn MD, Bowen DT (2000). Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologica*, **85(6)**, 573-579.

Wang Y, Fu X, Li H (2025). Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Front. Endocrinol.*, **16**.

Webb G, Vaska V, Coggan M, Board P (1996). Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics*, **33(1)**, 121-123.

Wu W, Lu J, Tang Q, Zhang S, Yuan B, Li J, Sha J, Wang X (2013). GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and male infertility risk: an updated meta-analysis encompassing 6934 subjects. *Sci. Rep.*, **3**, 2258.

Xiao X, Mruk DD, Wong CKC, Yan Cheng C (2014). Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology*, **29(4)**, 286-298.

Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S, Awasthi YC (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.*, **276(22)**, 19220-19230.

Ye L, Li X, Li L, Chen H, Ge RS (2017). Insights into the development of the adult Leydig cell lineage from stem Leydig cells. *Front. Physiol.*, **8**, 429.

Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, Sun X, Xue S, Han D (2003). Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, **69(1)**, 37-47.

Zeng F, Li C, Huang J, Xie S, Zhou L Le, Meng L, Li L, Wei H, Zhang S (2022). Glutathione S-transferase kappa 1 is positively related with sperm quality of porcine sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **89(2)**, 104-112.

Zhang T, Zhang S, Zhang C, Liu H, Liu M, Zhang GH, Duan G, Chen S, Ren J (2024). The moderation effect of GSTM1/GSTT1 gene polymorphisms on the association of sperm mitochondrial DNA copy number and sperm mobility. *Sci. Rep.*, **14(1)**, 6061.

