

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

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK
SIÇAN MODELİNDE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG
PROBİYOTİK UYGULAMASININ TESTİS DOKUSUNDA
DNA METİLASYONUNA ETKİSİ**

Gizem Gamze TAŞ DOĞAN

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

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

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK
SIÇAN MODELİNDE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG
PROBİYOTİK UYGULAMASININ TESTİS DOKUSUNDA
DNA METİLASYONUNA ETKİSİ**

Gizem Gamze TAŞ DOĞAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-6147 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../2023

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Koç Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Üye : Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Enver Kerem DİRİCAN
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ 2023 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Melike CENGİZ

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gizem Gamze TAŞ DOĞAN

İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca daimi destekçim olan, bana her zaman yol gösteren, akademik hayatta beni yüreklendiren ve yoluma ışık tutan, bilgi ve birikiminden her daim yararlandığım sevgili danışmanım, değerli hocam **Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN**'a,

Bu süreçte bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri başta olmak üzere manevi desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her daim hoşgörülü, güleryüzlü ve yardıma hazır olan, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına,

Maddi ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, doktora sürecim boyunca tüm stresimi ve kaygılarımı alan, her an yanımda olan yol arkadaşım, sevgili eşim **Özgür DOĞAN**'a, bu zorlu yolda beni her zaman desteklediği ve göstermiş olduğu anlayış ve sabır için,

Ve teşekkürlerimin en büyüğü tabi ki beni yetiştiren, bana her zaman inanan ve güvenen sevgili ailemin tüm fertlerine, canım annem ve canım babam **Tülay&Mikail TAŞ**'a ve canım kardeşlerim **Batuhan TAŞ** ve **Beren Ela TAŞ**'a bana her zaman maddi/manevi destek oldukları, emeklerini ve sevgilerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tip 1 diyabetes mellitus (T1DM), görülme sıklığı ve getirdiği çeşitli organ hasarları nedeniyle önemli bir hastalık olup, bu bireylerde artış gösteren bağırsak mikrobiyota disbiyozu epigenetik değişiklikleri etkileyebilmektedir. Çalışmamızda deneysel T1DM modelinde probiyotik ve parabiyotik *Lactobacillus Rhamnosus* GG (*LGG*) uygulamasının sıçan testisinde DNA metilasyonu üzerinden epigenetik değişiklikler üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Kontrol, sham, T1DM, *LGG* (probiyotik), T1DM+*LGG* (probiyotik tedavi edici), *LGG*+T1DM (probiyotik koruyucu), *inaktif LGG* (*İLGG*-parabiyotik), T1DM+*İLGG* (parabiyotik tedavi edici) ve *İLGG*+T1DM (parabiyotik koruyucu) deney grupları oluşturuldu. Sıçanların vücut ağırlıkları ve kan glukozları izlenerek testis ağırlık indeksi, epididimal sperm motilitesi, serum testosteron düzeyleri, testiküler histopatoloji, apoptoz, global DNA metilasyonu ve DNA metiltransferazların (DNMT'ler) immünolokalizasyon ve ekspresyon düzeyleri ile oksidatif stres değerlendirildi.

Bulgular: Diyabet grubunda kan glukozu ve oral glukoz tolerans testi (OGTT) ölçümlerinde yükselme izlenirken diyabeti tedavi edici ve koruyucu gruplarda azalma mevcuttu. Vücut ve testis ağırlıkları ile sperm motilitesi diyabet grubunda daha düşük olup probiyotik ve parabiyotik gruplarında kilo artışına ilaveten iç organ yağlanması izlendi. Patolojik testis histolojisi izlenen diyabet grubunda DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve 5-metilsitozinin ekspresyonunun azaldığı ancak apoptozun diyabet ve diyabeti tedavi edici gruplarda daha yüksek olduğu belirlendi. Diyabet ve diyabeti tedavi edici gruplarda testosteron azalırken, oksidatif stres artmış olarak tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda deneysel T1DM modelinde, *LGG* uygulamasının testisteki DNA metilasyonuna bağlı değişiklikler üzerindeki etkisi ilk kez tanımlandı. Bulgularımız diyabetik erkek bireylerde probiyotik ve parabiyotiklerin etkileri konusunda değerli bilgiler sağlamış olup, yeni hipotezlerin kurulmasına ve önerilerin yapılmasına kaynaklık yapabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Diyabetes mellitus, streptozotosin, *Lactobacillus Rhamnosus* GG, DNA metiltransferazlar, rat testis

ABSTRACT

Objective: Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an important disease due to its frequency and the various organ damages it causes, and the intestinal microbiota dysbiosis that increases in these individuals can affect epigenetic changes. Thus, here we aimed to investigate the possible effects of probiotic and parabiotic *Lactobacillus Rhamnosus* GG (*LGG*) application on the epigenetic changes through DNA methylation in the rat testis in the experimental T1DM model.

Method: Control, sham, T1DM, *LGG* (probiotic), T1DM+*LGG* (probiotic therapeutic), *LGG*+T1DM (probiotic preventive), inactive *LGG* (*ILGG*-parabiotic), T1DM+*ILGG* (parabiotic therapeutic) and *ILGG*+T1DM (parabiotic preventive) experimental groups were created. By monitoring the body weights and blood glucose of the rats, testicular weight index, sperm motility, testosterone levels, testicular histopathology, apoptosis, global DNA methylation, immunolocalization and expression levels of DNA methyltransferases (DNMTs), and oxidative stress were evaluated.

Results: While an increase was observed in blood glucose and oral glucose tolerance test (OGTT) measurements in diabetes group, there was a decrease in the diabetes treatment and preventive groups. Body and testis weights and sperm motility were lower in the diabetes group, and visceral fat was observed in addition to weight gain in the probiotic and parabiotic groups. It was determined that the expression of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B and 5-methylcytosine decreased in the diabetes group with pathological testicular histology, but apoptosis was higher in diabetes and diabetes treatment groups. Testosterone levels were decreased and oxidative stress was increased in diabetes and diabetes treatment groups.

Conclusion: The effect of *LGG* application on DNA methylation-related changes in the testis was described for the first time in the T1DM model. Our results provided important information regarding the effects of probiotics and parabiotics on diabetic men and may serve as a fundamental source for establishment of new hypotheses and recommendations.

Key words: Diabetes mellitus, streptozotocin, *Lactobacillus Rhamnosus* GG, DNA methyltransferases, rat testis

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi.....	3
2.1.1. Testisin Genel Yapısı.....	3
2.1.1.1. Seminifer Tübüller.....	4
2.1.1.2. Sertoli Hücreleri.....	5
2.1.1.3. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri.....	7
2.1.1.4. Peritübüler Miyoid Hücreler.....	9
2.1.1.5. Spermatogenez.....	10
2.1.1.6. Seminifer Epitel Döngüsü ve Spermatogenik Dalga.....	12
2.2. Diyabetes Mellitus.....	13
2.2.1. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Epidemiyolojisi.....	13
2.2.1.1. Diyabetes Mellitus Tanı ve Kriterleri.....	14
2.2.1.2. Diyabetes Mellitus Sınıflandırılması.....	15
2.2.1.3. Diyabetes Mellitus Semptomları ve Komplikasyonları.....	16
2.2.1.4. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM).....	18
2.2.1.5. Streptozotosin (STZ).....	20
2.2.2. T1DM ve Erkek Üreme Biyolojisi İlişkisi.....	21
2.3. Probiyotikler.....	23
2.3.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi.....	23
2.3.1.2. Probiyotik Olarak Tanımlanan Mikroorganizmalar.....	24
2.3.1.3. Probiyotiklerin Özellikleri ve Seçilme Kriterleri.....	25
2.3.1.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	26

2.3.1.5. Probiyotiklerin Klinik Önemi ve Potansiyel Uygulamaları..	28
2.3.1.6. Probiyotiklerin Antidiyabetik Etkileri.....	28
2.3.2. Parabiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi.....	30
2.3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	31
2.3.2.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	32
2.3.2.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG) ve T1DM İlişkisi.....	32
2.3.3. Probiyotikler ve Erkek İnfertilitesi.....	34
2.4. Epigenetik.....	35
2.4.1. Epigenetik Tanımı ve Mekanizmaları.....	35
2.4.1.1. DNA Metilasyonu.....	36
2.4.1.2. Histon Asetilasyonu.....	38
2.4.1.3. Kodlanmayan RNA'lar ile İlişkili Gen Susturma.....	39
2.4.1.4. DNA Metiltransferaz Enzim Ailesi (DNMT'ler).....	40
2.4.2. Epigenetik Programlama ve T1DM.....	43
2.4.3. DNA Metiltransferazlar ve Probiyotik İlişkisi.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	45
3.2. STZ'ye Bağlı Diyabet Modelinin Oluşturulması.....	47
3.3. Kan Glukoz Ölçümleri ve Oral Glukoz Testi (OGTT).....	49
3.4. Probiyotik Süt Ürünü Üretimi.....	49
3.5. Dokuların Toplanması ve Rutin Parafin Takibi.....	50
3.6. Testis Ağırlık İndeksinin Hesaplanması.....	51
3.7. Sperm Örneklerinin Toplanması ve Motilite Değerlendirmeleri.....	51
3.8. Histopatolojik Değerlendirmeler.....	51
3.8.1. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü.....	52
3.8.2. Hematoksilen-Eozin Boyama (H&E) Protokolü.....	52
3.8.3. Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlaması.....	52
3.9. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler.....	53
3.10. Western Blot Metodu.....	55
3.11. TUNEL Metodu.....	58

3.12. ELİSA Yöntemi ile Serum Testosteron Düzeyinin Belirlenmesi.....	59
3.13. Testiste Total Oksidan (TOS) Seviye Tayini.....	60
3.14. Testiste Antioksidan Seviye (TAS) Tayini.....	61
3.15. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'nin Belirlenmesi.....	62
3.16. İstatistiksel Analizler.....	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. Kan Glukoz Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	64
4.2. Oral Glukoz Tolerans Testi Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	66
4.3. Vücut Ağırlık Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	67
4.4. Testis Ağırlık İndeksinin Değerlendirilmesi.....	71
4.5. Epididimal Sperm Motilite Değerlendirmeleri.....	72
4.6. Hematoksilen Eozin ve PAS ile Testiküler Histopatolojiye Ait Bulgular.....	73
4.7. Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlaması Bulguları.....	76
4.8. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler.....	77
4.9. Western Blot Analizleri.....	85
4.10. TUNEL Bulguları.....	87
4.11. ELİSA Yöntemi İle Serum Testosteron Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	89
4.12. Total Oksidan Seviye (TOS) Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	90
4.13. Total Antioksidan Seviye (TAS) Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	91
4.14. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'nin Değerlendirilmesi.....	92
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	103
7. KAYNAKLAR.....	105
8. ÖZGEÇMİŞ.....	120

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1	Diyabetes mellitus tanı ve teşhisinde kullanılan kan glukoz parametreleri.....	14
Tablo 2.2	Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması.....	16
Tablo 2.3	Diyabetin semptomları.....	17
Tablo 2.4	Diyabetin komplikasyonları.....	18
Tablo 2.5	T1DM'yi T2DM'den ayıran özellikler.....	20
Tablo 2.6	Probiyotik olarak tanımlanan mikroorganizmalar.....	25
Tablo 2.7	Probiyotik bakterilerin sağlığa faydaları ve ilgili mekanizmalar.....	28
Tablo 2.8	T1DM patogeneğinde azalan ve artan suşlar.....	29
Tablo 3.1	Johnsen skorlaması ile tübüllerin değerlendirilmesi.....	53
Tablo 3.2	İmmünohistokimya ve Western Blot tekniğinde kullanılan primer ve sekonder antikor dilüsyonları.....	57
Tablo 4.1	Kontrol ve deney gruplarındaki kan glukoz ölçümlerinin karşılaştırılması.....	65
Tablo 4.2	Kontrol ve deney gruplarındaki OGTT'ye göre kan glukoz ölçümlerinin karşılaştırılması.....	66
Tablo 4.3	Kontrol ve deney gruplarındaki haftalık hayvan ağırlıklarının karşılaştırılması.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Erkek üreme sisteminin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2	Seminifer tübülün genel görünümü.....	5
Şekil 2.3	Sertoli hücrelerinin morfolojik gösterimleri ve seminifer epitel organizasyonu.....	7
Şekil 2.4	Komşu seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel alanda bulunan Leydig hücre toplulukları.....	9
Şekil 2.5	Testisin seminifer tübüllerinde memeli spermatogenezinin şematize gösterimi.....	12
Şekil 2.6	Epigenetik mekanizmaların şematize gösterimi.....	36
Şekil 2.7	DNA metilasyonunun şematize gösterimi.....	38
Şekil 2.8	Histon Asetilasyonunun şematize gösterimi.....	39
Şekil 2.9	ncRNA'ların ilişkili olduğu çeşitli epigenetik mekanizmalar.....	40
Şekil 2.10	Memeli DNMT'lerinin yapısal ve fonksiyonel alanları.....	42
Şekil 3.1	Projede oluşturulan deney gruplarının şematize gösterimi.....	47
Şekil 3.2	Deney modelinin şematize gösterimi.....	48
Şekil 3.3	Haftalık sıçan tartımları ve testis ağırlık tartımları.....	48
Şekil 3.4	STZ enjeksiyonu, enjeksiyon sonrasında kuyruktan kan alınması ve kan glukoz ölçümü.....	49
Şekil 3.5	Oral gavaj uygulaması.....	50
Şekil 4.1	Günlere göre kan glukoz takip grafiği.....	65
Şekil 4.2	Oral glukoz tolerans testine göre zamana bağlı kan glukoz grafiği.....	67
Şekil 4.3	Kontrol ve deney gruplarına ait haftalara göre kilo takip grafiği.....	68
Şekil 4.4	Kontrol ve deney gruplarına ait hayvanların vücut görüntüleri.....	69
Şekil 4.5	Kontrol ve deney grubu hayvanların iç organ görüntüleri.....	70
Şekil 4.6	Kontrol ve deney gruplarına ait testis ağırlık indeksi.....	71
Şekil 4.7	Kontrol ve deney gruplarına ait sperm motilitesi.....	72
Şekil 4.8	Gruplara ait testis dokularındaki PAS boyanmaları.....	74
Şekil 4.9	Gruplara ait testis dokularındaki H&E boyanmaları.....	75
Şekil 4.10	Kontrol ve deney gruplarına ait Johnsen skor ortalamaları.....	76
Şekil 4.11	Kontrol ve deney gruplarındaki testis dokularına ait DNMT1 immünolokalizasyonu.....	78

Şekil 4.12	Kontrol ve deney gruplarındaki testis dokularına ait DNMT3A immüno­lokalizasyonu.....	79
Şekil 4.13	Kontrol ve deney gruplarındaki testis dokularına ait DNMT3B immüno­lokalizasyonu.....	81
Şekil 4.14	Kontrol ve deney gruplarındaki testis dokularına ait 5-metilsitozin immüno­lokalizasyonu.....	82
Şekil 4.15	Kontrol ve deney gruplarındaki testis dokularına ait aktif kaspaz-3 immüno­lokalizasyonu.....	84
Şekil 4.16	DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve aktif kaspaz-3 proteinlerine ait Western Blot bantları.....	87
Şekil 4.17	Kontrol ve deney gruplarındaki pozitif seminifer tübüller ve % apoptotik indeks değ­erleri.....	88
Şekil 4.18	Kontrol ve deney gruplarına ait testosteron değ­erleri.....	89
Şekil 4.19	Kontrol ve deney gruplarına ait total oksidan seviyeleri.....	90
Şekil 4.20	Kontrol ve deney gruplarına ait total antioksidan seviyeleri.....	91
Şekil 4.21	Kontrol ve deney gruplarına ait oksidatif stres indeksi değ­erleri.....	92
Şekil 5.1	İmmünohistokimya, Western Blot, ELİSA, TUNEL ve TOS/TAS analizlerine ait sonuçlar.....	102

SİMGELER ve KISALTMALAR

AACE	: Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AC	: Asetilasyon
ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AKİDUAM	: Akdeniz Üniversitesi İstatistik Danışmanlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
AMH	: Anti Müllerian Hormon
APG	: Açlık Plazma Glukozu
AR	: Androjen Reseptörü
BAG	: Bozulmuş Açlık Plazma Glukozu
BGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
BAH	: Bromo Bitişik Homoloji Alanı
COOH	: C-Terminal Katalitik Alan
CPG	: Sitozin Guanin Adası
DER	: Düz Endoplazmik Retikulum
DM	: Diyabetes Mellitus
DNMT	: DNA Metiltransferaz
EASD	: Avrupa Diyabet Derneği
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
ELİSA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	: Endoplazmik Retikulum
FSH	: Folikül Stimülan Hormon
GD	: Gestasyonel Diyabet
HAT	: Histon Asetiltransferaz
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HDAC	: Histon Deasetilaz
HE	: Hematoksilen Eozin
HRP	: Horseradish Peroksidaz
IDF	: Güneydoğu Asya Uluslararası Diyabet Federasyonu

IncRNA	: Uzun Kodlamayan RNA
İLGG	: <i>İnaktif Lactobacillus Rhamnosus</i> GG
JDRF	: Diyabet Araştırmaları Vakfı
KKŞİ	: Kılcal Kan Şekeri İzleme
KTB	: Kan Testis Bariyeri
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LGG	: <i>Lactobacillus Rhamnosus</i> GG
LH	: Luteinizan Hormon
mC	: Metilsitozin
MDA	: Malondialdehit
mi-RNA	: Mikro RNA
NaCl	: Sodyum Klorür
ncRNA	: Kodlayıcı Olmayan RNA
NH3	: N-Terminal Düzenleyici Alan
OD	: Optik Dansite
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PAS	: Periyodik Asit Shift
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PG	: Plazma Glukozu
PTM	: Peritübüler Miyoid Hücre
RFT	: Çoğaltma Odakları Hedefleme Dizi Alanı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SGM	: Sürekli Glukoz Monitörü
SKH	: Spermatogonyal Kök Hücreler
STZ	: Streptozotosin
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TE	: Tris Edta
TOS	: Total Oksidan Seviye
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı dUTP Nick End Labeling
T1DM	: Tip 1 Diyabetes Mellitus

T2DM : Tip 2 Diyabetes Mellitus
UHT : Ultra High Temperature



1. GİRİŞ

İnsüline bağımlı diyabet olarak da bilinen tip 1 diyabet (T1DM), pankreas β hücrelerinin çok az insülin ürettiği veya hiç insülin üretmediği, dolayısıyla glukozun enerji üretmek için hücrelere girmesine izin veremediği kronik bir durumdur. Çalışmalar, bağırsak mikrobiyotası ve T1DM arasında bir bağlantı olduğunu rapor etmiştir. Bağırsak mikrobiyotası tarafından salgılanan metabolitler, bağışıklık tepkisini düzenleyerek T1DM sürecinin gelişimini yavaşlatabilmektedir. Literatürde 900'den fazla yayınlı, öncelikle bağırsak sağlığı için en çok araştırılan probiyotik tür haline gelen *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)'nin diyabetik hayvan modellerinde anti-hiperglisemik etki göstererek glukoz toleransını iyileştirdiği bilinmektedir.

T1DM'in, genetik ve epigenetik değişiklikler gibi birbiriyle bağlantılı birkaç faktörden kaynaklanan otoimmün bir bozukluk olduğu da bilinmektedir. Epigenetik gen düzenlemesinde rol oynayan kilit mekanizmalar arasında, özellikle DNA metilasyonu ve DNA dizisinin işlevsel niteliklerini değiştiren histon modifikasyonları bulunur. DNA metilasyonu, spesifik DNA metiltransferaz (DNMT'ler) enzimleri tarafından katalize edilir. T1DM patogenezi altında yatan DNMT'ler aracılı epigenetik değişikliklerin testiste nasıl düzenlendiği hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir.

Bu çalışmanın amacı, STZ ile indüklenen deneysel T1DM modeli oluşturulan erişkin sıçanların testis dokularında probiyotik LGG kullanılarak üretilen fermente süt uygulamasının DNA metilasyonuna bağlı epigenetik değişiklikler üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, sıçan hayvan modelinde kontrol, sham, T1DM (STZ), LGG (probiyotik), T1DM+LGG (probiyotik tedavi edici), LGG+T1DM (probiyotik koruyucu) ve inaktif LGG (İLGG-parabiyotik), T1DM+İLGG (parabiyotik tedavi edici), İLGG+T1DM (parabiyotik koruyucu) grupları oluşturularak; kan glukoz ve OGTT ölçümleri gerçekleştirildi, vücut ağırlığı, testis ağırlık indeksi ve sperm motilitesi kaydedildi. Testiküler hücre hasarı hematoksilin eozin (H&E), periyodik asit schiff (PAS) ve modifiye Johnsen skoru ile değerlendirildi. Testis dokularında DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve aktif kaspaz-3 ekspresyon ve lokalizasyonları immünohistokimya ve Western Blot yöntemleriyle analiz edildi. Serum testosteron düzeyleri ELİSA ile, apoptotik tübül indeksi ise TUNEL yöntemi ile değerlendirildi.

Testis dokularında oksidatif stresi ölçmek amacıyla oksidan ve antioksidan seviye tayini yapılarak oksidatif stres indeksi hesaplandı.

Bulgularımızda, T1DM uygulamasının diyabet grubunda kan glukozu ve OGTT değerlerini arttırdığı, probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda zamana bağlı azalış olduğu görüldü. Diyabet grubu hayvanlar diyabete bağlı kilo kayıpları yaşarken, *LGG* ve *İLGG* takviyeleri hayvanlarda kilo alımına ve iç organ yağlanmasına neden oldu. Diyabet grubu hayvanların testis ağırlıklarında azalma olduğu belirlenirken, diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda testis ağırlıklarında herhangi bir farklılık bulunmadı. Diyabet ve diyabeti tedavi etmek amacıyla oluşturulan gruplara ait epididimal sperm motilitesinde azalma görülmesine rağmen, probiyotik ve parabiyotiklerin tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel olarak daha yüksek sperm motilite yüzdeleri olduğu belirlendi. Histopatolojik değerlendirmelerde özellikle diyabet grubunda şiddetli patolojiler gözlenirken, diyabeti tedavi etmek için oluşturulan gruplarda bu patolojilerin çok aza indirildiği dikkat çekti. İmmünohistokimya ve Western Blot analizlerinde DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve 5-metilsitozin (global DNA metilasyonu) ekspresyonları açısından kontrol grubuna kıyasla diyabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, diyabet grubuna kıyasla probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme olduğu tespit edildi. Aktif kaspaz-3 ve TUNEL bulguları, başta diyabet olmak üzere diyabeti özellikle tedavi edici etkilerin değerlendirildiği gruplarda apoptotik tübül sayısı ve indeksi açısından istatistiksel olarak artma olduğunu işaret ederken, probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. Testosteron düzeyleri diyabet ve diyabeti tedavi edici gruplarda azalırken, oksidatif stres, bu gruplarda artış gösterdi. Bununla birlikte bulgularımız, T1DM'den muzdarip erkek bireylerde hem probiyotik hem de parabiyotiklerin infertilite çalışmaları kapsamında sağlığa faydalı olabileceğini ortaya koymuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi

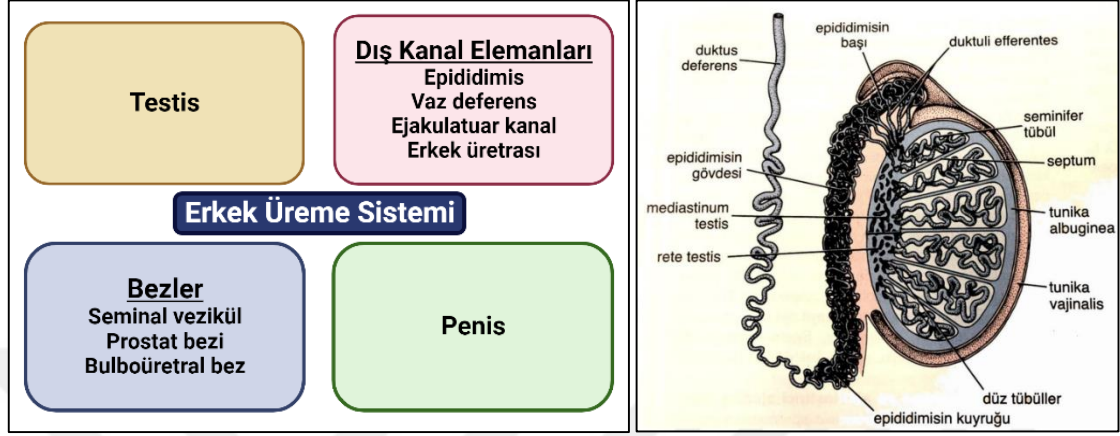
Erkek üreme sistemi, testisler, yardımcı bezler, genital kanallar ve penisten oluşmaktadır (Gurung ve ark., 2023). Yardımcı üreme bezleri ise seminal veziküller, prostat ve bulboüretral bezleri (Cowper bezleri) içermektedir (Gurung ve ark., 2023) (**Şekil 2.1**).

2.1.1. Testisin Genel Yapısı

Testisler, anteriör abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren ve skrotum içerisine uzanan uzun bir muskulofasiyal kesenin ucunda askıda yer alan bir çift organdır. Ekstraabdominal yerleşim gösteren testislerin en temel görevi arasında spermatogenez ve steroidogenez yer alır (Titi-Lartey ve ark., 2023). Bu süreçlere ek olarak endokrin ve ekzokrin işlevleri sayesinde embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu üzerinde önemli etkilere de sahiptirler (Titi-Lartey ve ark., 2023).

Yapısal olarak bakıldığında testiküler kapsülün üç katmandan oluştuğu görülmektedir. İlk tabaka olan tunika vaginalis, en dışta bulunan ve mezotelyal hücrelerden oluşan tabakadır. Tunika vaginalis testisin ön ve yan yüzeylerini çevreler. Tunika albuginea olarak isimlendirilen bağ doku formundaki ikinci tabaka, kapsülün en belirgin tabakasıdır ve bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılmıştır. Testiküler kapsülün en iç tabakası ise tunika vasküloza olup, kan damarları açısından oluşmaktadır (Langford ve ark., 1973; Gartner L. P., 2012). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis, testisi yaklaşık 250-400 lobüle böler ve her bir lobülde seminifer tübül ve Leydig hücrelerinin bulunduğu bağ dokusu yer alır (Gartner L. P., 2012) (**Şekil 2.1**). Testise özgü olan epitel seminifer ya da germinal epitel olarak isimlendirilir. Bu epitel farklılaşan germ hücrelerini ve destekleyici Sertoli hücrelerini içermektedir (Wong ve ark., 2023). Seminifer tübüllerde spermatogenez gerçekleşirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılamaktadır (Wong ve ark., 2023). Spermatozoon ile birlikte genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı, penis yoluyla dışı üreme sistemine bırakılan semeni (ejakülat) oluşturur (Ananthakumara ve ark., 2020). Semen %10'undan daha azını spermiler oluşturken diğer %90'lık kısmının %65'ini

seminal vezikül, %25'ini prostat ve %10'unu ise bulboüretral bez salgıları oluşturmaktadır (Anamthathmakula ve ark., 2020).

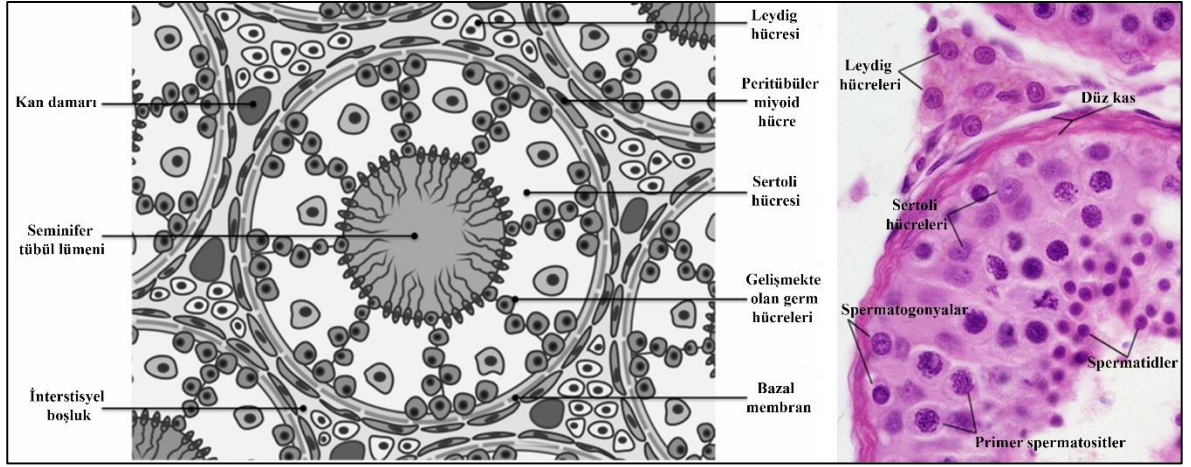


Şekil 2.1. Erkek üreme sisteminin şematik gösterimi (Ross MH, 2017).

2.1.1.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller tunika propriya ile çevrelenmiş, her biri yaklaşık 150-250 µm çapta ve 80 cm uzunluğunda olan spermatogenik germ hücrelerinin spermatozoonlara farklılaştığı yerdir. Seminifer tübüllerin iki ucu U şeklinde olup rete testise açılır. Anastomozlaşan kanallar ağı olarak bilinen rete testis, seminifer epitelin salgılarını toplamakla görevlidir (Şekil 2.2).

Seminifer tübülü en dıştan çevreleyen tunika propriya, bazal membran ve çok katlı epitelden oluşur. Tunika propriyanın iç katmanında bazal laminaya bitişik, düz kas karakterinde bol miktarda miyoid hücresi bulunur (Ross MH, 2017; Mescher, 2019). Miyoid hücreler, peristaltik kasılmalar yaparak spermın boşaltım kanallarına taşınmasını sağlarlar (Fleck ve ark., 2021). Daha sonra sperm hücreleri motilite özelliklerini kazanmak için epididimise geçerler (Fleck ve ark., 2021). Seminifer tübüllerin yapı taşı olan seminifer epitel başlıca Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden (spermatogonya, spermatosit, spermatid) oluşur (Wong ve ark., 2023). Seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel alanda ise, makrofajlar, kan damarları, lenfatik kanallar, az sayıda lenfosit ve Leydig hücreleri bulunmaktadır (Bhushan ve ark., 2020) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Seminifer tübülün genel görünümü (Luís Rato, 2012).

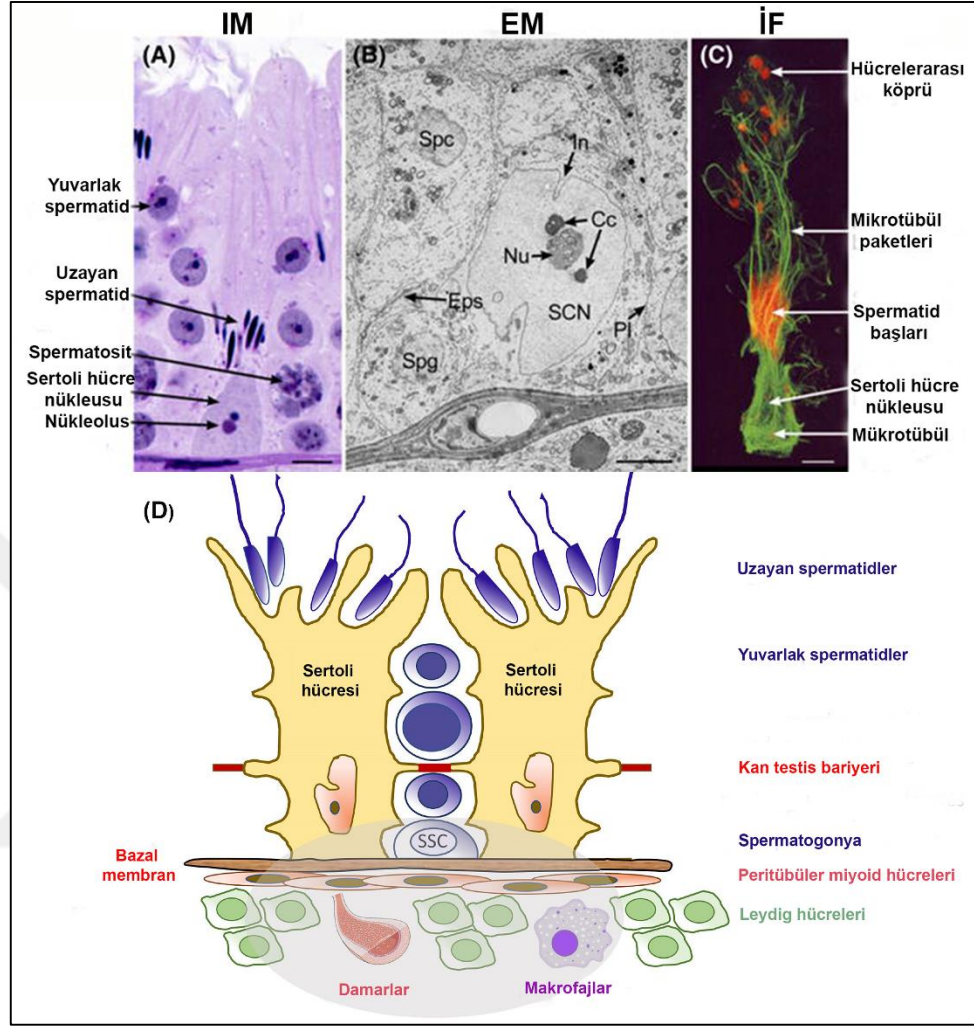
2.1.1.2. Sertoli Hücreleri (Destek Hücreleri)

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin lümenine uzanan ve puberteye kadar belirgin olan prizmatik şekilli hücrelerdir (Griswold, 2018). İlk olarak 1865 yılında genç bir İtalyan doktor olan Enrico Sertoli tarafından gözlemlenmiş ve onun adını almıştır (Griswold, 2018). Sertoli hücrelerinin membran sınırları gelişmekte olan spermatogonik hücrelere kriptalar sağladığı için düzensizdir (Wan ve ark., 2013). Işık mikroskopunda renkleri soluk görünmekte ve sınırları açık şekilde ayırt edilememektedir. Nükleusları olukludur ve belirgin heterokromatin nükleolus içermektedir. Sitoplazmalarında endoplazmik retikulum, yaygın bir golgi kompleksi, mitokondriler, lizozomlar, lipid damlacıkları, mikrotübüller ve mikrofilamentler bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2006) (**Şekil 2.3**).

Çok uzun ve oldukça polarize olan Sertoli hücreleri, kan-testis bariyerinin (KTB) anatomik temeli olan bir bazal membran ve belirgin bir sıkı bağlantı ağını barındıran bir epitel oluşturmaktadır (Gerber ve ark., 2016). Sıkı bağlantılar tübülü bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır. Bu bağlantılardan ilki, bağlantı noktası ile bazal membran arasında bulunan, plazma bileşenlerinin serbestçe ulaşabileceği kompartmandır. İkincisi ise plazma ve bağışıklık hücrelerinden yalıtılmış olan bölgedir (Cheng ve ark., 2012). Kök hücreleri ve farklılaşmaya yönelik çoğalan hücreleri içeren mitotik germ hücreleri olan spermatogonyalar, bazal kompartmanda bulunur. Mayoza girdikten sonra bu hücreler spermatosit olarak isimlendirilir ve adluminal kompartmana doğru yer değiştirirler (Cheng ve ark., 2012). Puberteden önce hücre döngüsünü sonlandırmış olan

Sertoli hücreleri, plazma zarlarını aşırı derecede genişletir ve aynı anda dört farklı aşamadaki germ hücrelerini (spermatogonya, spermatositler, yuvarlak spermatidler ve uzayan spermatidler) plazma zarlarının farklı bölgelerinde tutabilirler (Franca ve ark., 2016). Böylece, tek bir Sertoli hücresi, germ hücre farklılaşmasının farklı aşamaları için uygun olan çeşitli mikro ortamlar sağlayarak, germ hücrelerinin bazaldan apikal kısma doğru aşamalı olarak farklılaşmasını destekleyebilir. Dolayısıyla Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, mayotik ve haploid hücrelere özel olarak yalıtılmış bir mikro ortam sağlamak için önemlidir (Franca ve ark., 2016) (**Şekil 2.3**).

Sertoli hücrelerinin testisteki önemli görevleri arasında, gelişen spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek, spermiyogenez sonunda sitoplazmik artık cisimleri fagosite etmek, kendi aralarında engelleyici bağlantılar yaparak kan testis bariyerinin oluşturulmasını sağlamak, spermatogeneizde gerekli olan testosteron miktarını arttıran, androjen bağlayıcı protein (ABP); ön hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) üretimi ve salınımını engelleyen inhibin ve uyarıcı aktivin hormonlarını salgılamak yer almaktadır. Sertoli hücreleri, sperm iletimini desteklemek amacıyla, seminifer tübül lümenine proteinler, iyonlar ve fruktoz açısından zengin bir sıvı da salgılamaktadır. Ayrıca bu hücreler fetal gelişim sırasında erkekte, Müller kanallarının gerilemesine neden olan Anti Müllerian hormon (AMH) ile testosteronu östrojene çevirerek küçük miktarlarda da olsa östrojen hormonlarının salgılanmasını gerçekleştirirler.



Şekil 2.3. Sertoli hücresinin morfolojik gösterimleri (A,B,C) ve seminifer epitel organizasyonu (D). A) PAS ile boyanmış seminifer epitelin ışık mikroskopik görüntüsü. B) Germ hücreleriyle çevrili Sertoli hücresinin elektron mikroskopik görüntüsü. Spermatozoa (Spc); Spermatoz (Spc). Sertoli hücresi, oldukça önkromatik bir nükleusa (SCN), iki uydu kromomerkezli (Cc) büyük bir nükleolusa ve nükleer zar girintisine (In) sahiptir. Plazmalemma (Pl); Kan-testis bariyerinde ektoplazmik özelleşme (EPS). C) Sertoli hücresinin immüno Floresan mikroskopi ile gösterimi (Franca ve ark., 2016). D) Germ hücrelerinden (mavi) ve somatik Sertoli hücrelerinden (sarı) oluşan seminifer epitelin organizasyonu ve spermatozoal kök hücre (SSC) nişi gösterilmektedir (Hofmann ve ark., 2022).

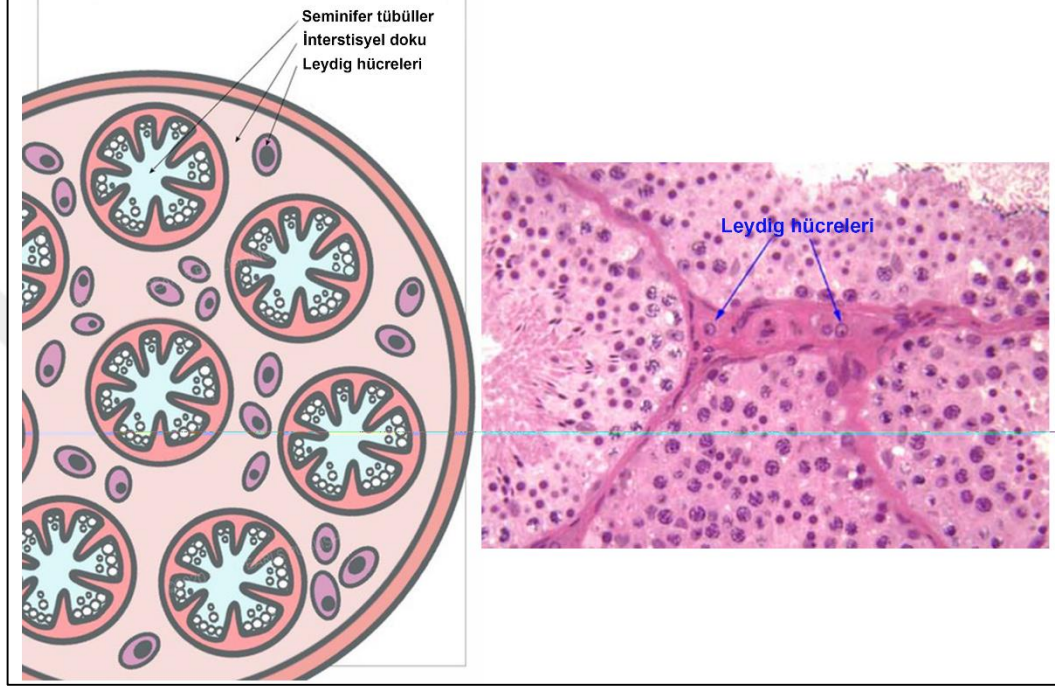
2.1.1.3. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücresi

Seminifer tübüllerin boşluklarında yer alan ve testisin yaklaşık %25 ile %30'unu oluşturan interstisyel doku, bağ dokusu yapısında olup Leydig hücresi, kollajen lifleri, makrofaj, fibroblast, mast hücresi, lenfosit, kan ve lenf damarları ile birlikte sınırları içermektedir (Lin J. B. ve ark., 2014) (Şekil 2.4).

Leydig hücreleri, testiküler interstisyel dokunun ana steroidogenik hücre popülasyonudur. Erkek üreme sistemindeki en iyi bilinen rolleri, spermatogenezin devamı için gerekli olan steroid yapıdaki testosteronu üretmeleridir (Huhtaniemi ve ark., 2018). Testosteron önemli olup, hipofiz testis aksını aktive ederek spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinde rol oynar (Bhushan ve ark., 2020). Androjen reseptörüne (AR) bağlanması ile testosteronun cinsel davranış, fertilité ve kemik gelişimi gibi yetişkin sağlığı üzerinde bir çok etkisi bulunmaktadır. Erkek fetusta gonad gelişimi testosteron ve androjenlerin varlığıyla doğrudan ilişkilidir. Puberteye gelindiği zaman ise testosteron varlığı, sperm üretimi, aksesuar cinsiyet bez salgıları ve sekonder seks karakterlerinin oluşmasında önemlidir (Chang ve ark., 2013). Leydig hücreleri, kan damarlarının yakınında intertübüler alanda yerleşmişlerdir (Huhtaniemi ve ark., 2018). Merkezi bir nükleusa sahip, eozinofilik sitoplazmalı, poligonal ya da yuvarlak şekilli hücrelerdir (**Şekil 2.4**). Bu hücrelerin eozinofilik olmalarının nedeni, bol miktarda düz endoplazmik retikulum (DER) içermeleridir (Huhtaniemi ve ark., 2018). Ayrıca, tübüler kristal mitokondriyon, iyi gelişmiş DER ve lipit damlacıkları içermektedirler. Sitoplazmalarında lipofuksin pigmenti ve Reinke kristalleri de görülmektedir (Lin J. B. ve ark., 2014).

Puberte döneminde testosteron üretimi, hipotalamustan gonadotropin salgılayıcı hormonun üretilmesiyle başlamaktadır. Geç embriyonik dönemde testis gonadotropini plasenta tarafından salgılanır ve erkek üreme sistemine ait bez ve kanalların gelişebilmesi için Leydig hücrelerini uyarak gerekli testosteron üretilmesini sağlar (Lanciotti ve ark., 2018). Fetal Leydig hücreleri özellikle gebeliğin 3. ve 4. aylarında daha çok etkilidirler. Bu hücreler, erkek cinsel organının farklılaşması için gerekli olan yüksek düzeyde androjen (türe bağlı olarak testosteron veya androstenedion) üretmekten sorumludurlar. Testosteron üretimi, fetal Leydig hücrelerinin sayısındaki doğum sonrası düşüşle birlikte azalır ve doğum sonrası erken dönemde en düşük seviyeye ulaşır. Daha sonra neonatal testisin kök hücrelerinden yetişkin Leydig hücrelerinin gelişmesiyle testosteron kademeli olarak yüksek seviyelere çıkar (Lanciotti ve ark., 2018). Yetişkin Leydig hücreleri bir kez oluştuktan sonra nadiren değişir veya ölür. Puberte sonrasında Leydig hücreleri, siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılığındaki bir mekanizma ile LH tarafından uyarılmanın ardından, dihidrotestosterona dönüştürülebilen testosteronu 5α -redüktaz aracılığıyla üretirler (Svechnikov ve ark., 2010). Serumda bulunan

testosteronun yaklaşık %95'lik kısmı (seks hormon-bağlayıcı globülin veya başka proteinlere tutunmuş şekilde) Leydig hücrelerinden üretilirken, geriye kalan kısım ise adrenal korteksten sentezlenmektedir (Svechnikov ve ark., 2010).



Şekil 2.4. Komşu seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel alanda bulunan Leydig hücre toplulukları.

2.1.1.4. Peritübüler Miyoid Hücreler

Peritübüler miyoid hücreler (PTM), testisteki seminifer tübülleri çevreleyen düz kas hücreleridir (Maekawa ve ark., 1996). Bu hücreler, sadece tübülün yapısal bütünlüğünü sağlamakla kalmayıp aynı zamanda spermatogenez ve testis fonksiyonunun düzenlenmesinde de önemli görevlere sahiptir. Miyoid hücreler bağlantı kompleksleri ile birbirlerine sıkıca bağlanır ve içerdikleri bol miktarda aktin filamanı sayesinde, seminifer tübüllerin düzensiz kasılmalarına olanak sağlamaktadır. Böylece Sertoli hücreleri tarafından üretilen salgının ve spermatositlerin lümene atılmasını kolaylaştırırlar. Kasılma mekanizmaları tam olarak bilinmese de çeşitli maddelerin (prostaglandinler, oksitosin, TGFβ, NO/cGMP) hücrenin kasılmasını etkilediği ortaya konulmuştur. Miyoid hücreler, testis gelişiminde önemli olan androjen reseptörü içermekte olup retinol işlevinde de görev almaktadır (Maekawa ve ark., 1996).

2.1.1.5. Spermatogenez

Spermatogenez süreci, seminifer tübüllerde gerçekleşen ve olgun gametlerin oluşmasını sağlayan karmaşık bir süreçtir (de Kretser ve ark., 1998). Bu süreç içerisinde, spermatogonyal hücrelerin çoğalması, spermatogonyal hücrelerden spermatositlere farklılaşma, spermatositlerden spermatid üretimi, yuvarlak spermatidlerin olgunlaşması ve olgun spermin lümene salınması gerçekleşmektedir (de Kretser ve ark., 1998). Spermatogonyal kök hücreler (SKH), bazal lamina üzerinde yerleşime sahip, kendini yenileme ve spermatogenik seri hücrelerine farklılaşabilme özelliklerine sahip serinin en olgunlaşmamış hücresidir. Spermatogenik serinin en olgun hücresi olan spermatidler, tübül lümeninin sınırını oluşturmaktadır. Spermatogenez, spermatogonyumların bölünmesiyle başlar ve olgun sperm oluşumuyla tamamlanır (Griswold, 2016). Spermatogenezin tamamlanma süreci yaklaşık olarak farelerde 34, sıçanlarda 54 ve insanlarda 74 gündür (Perrard ve ark., 2016).

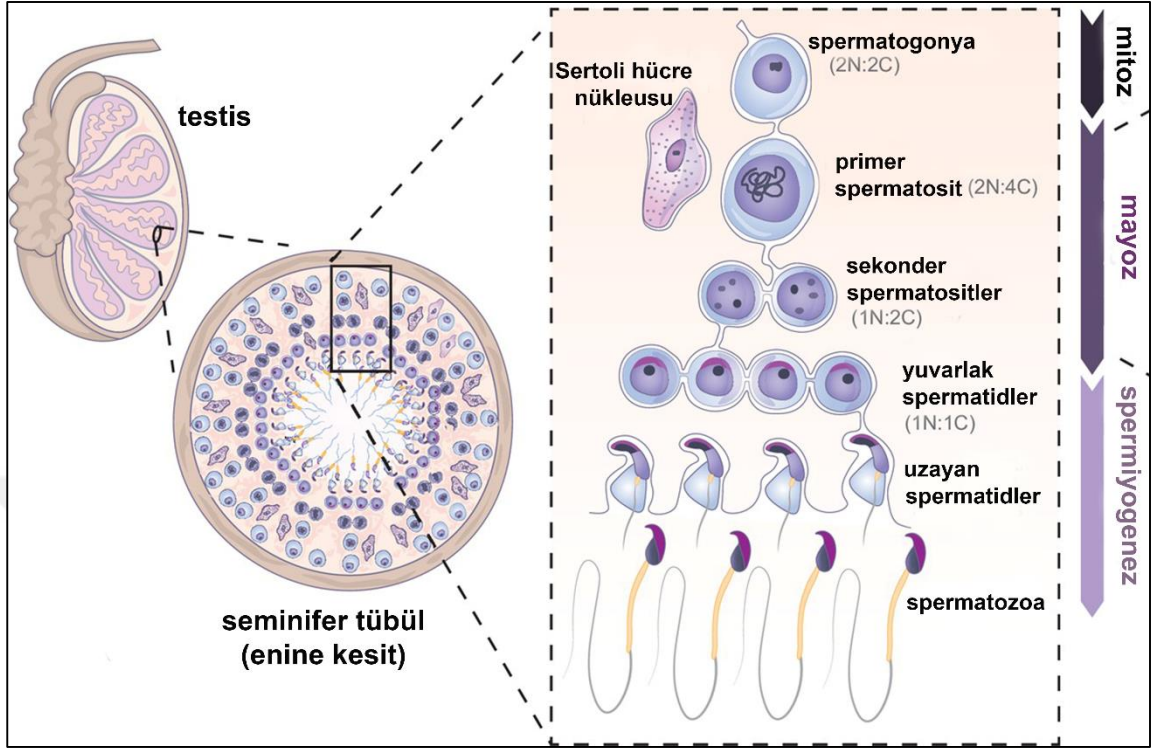
Spermatogenez, puberteden yaşlanmaya kadar sürekli olarak devam eden bir süreçtir ve üç farklı aşamaya ayrılır: mitotik bölünmeler, mayotik bölünmeler ve spermiyogenez aşaması (Süet, 2022) (**Şekil 2.5**). İlk aşama, spermatogonyal çoğalma ve yenilenme olarak isimlendirilir. Bu süre zarfında, nispeten farklılaşmamış diploid spermatogonyal kök hücreler, primer spermatositler adı verilen büyük bir hücre popülasyonu oluşturmak için birkaç mitotik bölünme geçirir (Süet, 2022). Spermatogenez başlangıcında, bazal laminanın hemen yanında iki spermatogonyal hücre tipi bulunmaktadır; 1) Tip A (insan testisinde koyu ve açık), 2) Tip B spermatogonyum (Phillips ve ark., 2010). Tip A kök hücrelerden bazıları tip B'ye dönüşmek üzere mitoz bölünmeye uğrar. Bu süreci yöneten mekanizmalar tam olarak bilinmese de, hangi tip B kök hücrelerin primer spermatositlere farklılaşacağına önceden kararlaştırdıkları düşünülmektedir (Phillips ve ark., 2010).

İkinci aşamada spermatositler, haploid germ hücrelerinin, spermatidlerin oluşumuna yol açan iki mayotik bölünme sürecinden geçer. Bölünme, profazın leptoten aşamasıyla başlar ve zigoten, pakiten ve diploten evreleriyle devam eder (Süet, 2022) (**Şekil 2.5**). Bu evrelerde; homolog kromozom eşleşmesi için gerekli sinaptonemal kompleks oluşumu, homolog kromozomların eşleşmesi (sinaps), crossing over (homolog kromozomlarda

kardeş olmayan kromatidleri arasında bilgi değişim evresi) ve homolog kromozomların ayrılma olayı (disjunction) gibi 4 önemli olay gerçekleşir (Süet, 2022).

Profaz evresinden sonra kardeş kromatidler, çift olarak metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçip sekonder spermatositlere ayrılarak ikinci mayoz bölünmenin ardından spermatidlere farklanır (Bergmann, 2005) (**Şekil 2.5**). Mayoz bölünmenin profaz I aşamasında primer spermatositler DNA miktarını ikiye katlar. Her bir primer spermatosit 2 katı kromozom sayısına ($4n$) ve 2 katı DNA'ya sahiptir (Bergmann, 2005). Sekonder spermatositler primer spermatositlere göre daha küçük boyutlu olup diploid sayıda DNA'ya ($2n$) sahiptir. Sekonder spermatositler herhangi bir bölünme geçirmeden 2 adet spermatid meydana getirirler. Oluşan spermatidler haploid kromozoma ve normalin yarısı kadar DNA miktarına sahiptir (Bergmann, 2005) (**Şekil 2.5**).

Üçüncü aşamada, spermatidler bir dizi karmaşık sitolojik dönüşümden geçer ve bu aşamada spermatidlerin olgun spermatozoaya dönüşmesi (spermiyogenez) sırasında sitoplazma kaybı ve flagella gelişimini içeren bir süreç meydana gelir (Bergmann, 2005) (**Şekil 2.5**). Spermiyogenez, spermatidlerin hareket yeteneğine sahip uzun kamçılı germ hücrelerine dönüşmesidir (de Kretser ve ark., 1998; Bergmann, 2005). Olgun germ hücrelerinin salınması spermiyasyon olarak tanımlanır (Griswold, 2016). Germ hücreleri, testis hacminin çoğunu oluşturur. Normalden daha küçük bir boyut, testis hasarını gösterir. Bu olaylar, seminifer tübüllerin uzunluğu boyunca belirli bir zamansal ve uzaysal modelde meydana gelir (Jaideep S. Toor, 2017). Spermatogenezin hormonal kontrolü türler arasında farklılık gösterir. Spermatogenezin başlaması, hipotalamus, hipofiz bezi, Sertoli ve Leydig hücrelerinin etkileşimleri nedeniyle puberte başlangıcında gerçekleşir (Jaideep S. Toor, 2017). Hipofiz bezi çıkarılsa dahi, spermatogenez süreci FSH ve testosteron hormonları tarafından başlatılabilir. Hipofizin ön lobundan salgılanan diğer bir hormon olan Luteinizan (Luteinleştirici) hormon (LH), Leydig hücrelerindeki LH reseptörlerinin uyarılmasını sağlar ve testosteronun sekresyonuna neden olur. Sertoli hücrelerinden salgılanan ABP, testosteronun seminifer tübül lümenine taşınmasını ve spermilerin olgunlaşmasını sağlar.



Şekil 2.5. Seminifer tübüllerde memeli spermatogenezinin şematize gösterimi (Subrini ve ark., 2021).

2.1.1.6. Seminifer Epitel Döngüsü ve Spermatogenik Dalga

Seminifer epitel döngüsü, Sertoli hücreleri ile seminifer epitel içinde gelişen germ hücreleri arasında meydana gelen hem adluminal hem de bazal bölmedeki tüm hücreler etkileşimleri ifade etmektedir (Griswold, 2016). Farklılaşmamış bir kök hücrenin olgun bir sperm haline gelmesi 74 gün sürmektedir. Her bir kök hücre, her hücre bölünme döngüsü arasında 16 günlük bir dinlenme dönemine girer ve böylece 16 günlük aralıklarla epitel altında yeni bir hücre seti oluşturur (Wanda M. Haschek, 2010). Böylece, her 16 günde bir lümene yeni bir sperm hücresi salınır. Bu yinelenen 16 günlük süre 'seminifer epitel döngüsü' olarak isimlendirilir (Wanda M. Haschek, 2010). Seminifer epitel döngüsü, tübülün belirli bir noktasında belirli bir süre boyunca gerçekleşir (Griswold, 2016). Döngü ilerledikçe, germ hücreleri germinal epitelin bazal kısmından lümene doğru hareket eder. Ardışık döngüler, bir önceki tamamlanmadan önce başlar, böylece epitelin farklı derinliklerinde bir tübül boyunca herhangi bir noktada döngünün farklı aşamaları görülür (Griswold, 2016). Yetişkin sıçan testisinde seminifer epitel döngüsü 14 evreye bölünmektedir (farelerde 12, insanlarda 6 evre). Bu evreler, Sertoli

hücreleriyle gelişmekte olan spermatidler arasındaki eşsiz ilişki ile karakterize edilir (Wanda M. Haschek, 2010). İnsanlarda bu döngü, bazı laboratuvar hayvanlarında olduğu gibi seminifer tübülün tüm uzunluğu boyunca aynı anda değil, segmentlerde meydana gelir (D.F. Cameron, 2014). Bu karmaşık olaylar dizisi, olgun spermilerin sürekli olarak üretilmesini sağlamak için önemlidir (D.F. Cameron, 2014).

Seminifer tübül boyunca yer alan 14 evrenin tamamı ve ayrıca tübülün o bölümünde mevcut olabilecek herhangi bir modülasyon “spermatogenik dalga” olarak isimlendirilmektedir (Wanda M. Haschek, 2010). Dolayısıyla bir seminifer tübülün uzunluğu boyunca bir aşama diğerini takip ederse seminifer epitelde bir dalga oluşur. Seminifer epitel döngüsü, belirli bir süre boyunca belirli bir yerde meydana gelirken, spermatogenik dalga, tübülün uzaysal bir organizasyonu olup tek bir anda meydana gelir. Seminifer epitel döngüsü ve spermatogenik dalga, seminifer tübülleri sperm üretimi için yüksek verimli bir fabrika haline getirir (Yoshida, 2016).

2.2. Diyabetes Mellitus

2.2.1. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Epidemiyolojisi

Diyabetes mellitus ya da diyabet, çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle birlikte vücutta insülin hormonunun yetersizliği veya insülin direnci ile oluşan, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının da etkilendiği hiperglisemi ile karakterize edilen kronik bir hastalıktır (Dilworth ve ark., 2021). Diyabet, idrar ve kanda artan glukoz miktarı sonucu çoklu komplikasyonların beraberinde getirdiği ölümle de sonuçlanabilen son derece önemli bir toplum hastalığıdır (Deshpande ve ark., 2008). Son yıllardaki hem yaygınlığı hem de görülme sıklığı bariz şekilde artış göstermektedir. Diyabete bağlı hastalık yükü oranı, obezite ve sağlıklı yaşam tarzlarının yaygınlığındaki küresel artış nedeniyle her ülkede yüksektir ve artmaya devam etmektedir (Deshpande ve ark., 2008). Tüm diyabetik bireylerin yaklaşık %5'ini tip 1, %90'ını tip 2 ve %5'ini de diğer alt tipler oluşturmaktadır (Saul ve ark., 2018). Diyabet insidansı ve prevalansı son 30 yılda tüm dünyada hızla yükselmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu, farklı yaşlardaki yetişkinler arasında (20-79 yaş) 2017'de 425 milyon olarak belirlenen diyabet tanısı almış birey sayısının, 2045'te 629 milyona ulaşacağı rapor edilmiştir. Diyabet prevelansının, 2017'de %8.8

iken, 2045 yılında %9.9'a yükseleceği açıkça belirtilmektedir. Dünya çapında 2017 yılında vefat eden diyabetik birey sayısının yaklaşık 4 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir (Saul ve ark., 2018). 20-79 yaş grubundaki insanlarda tespit edilen diyabet hastalığı dünya genelindeki tüm ölüm nedenlerinin %10.7'sini oluşturmaktadır (Saeedi ve ark., 2020).

2.2.1.1. Diyabetes Mellitus Tanı ve Kriterleri

Diyabet tanısının konulmasında kullanılan dört tanı kriteri bulunmaktadır. Bu kriterler, oral glukoz tolerans testi (OGTT), açlık plazma glukozu (APG), plazma glukozu (PG) ve hemoglobin A1c (HbA1c)'dir. Bu tanı kriterlerinin bir ya da daha fazlasının görülmesi durumunda diyabet tanısı konulabilir (Saul ve ark., 2018). Belirtilen bu tanı kriterleri ve değerleri Tablo 2.1'de sunulmuştur (**Tablo 2.1**).

Tablo 2.1. Diyabetes mellitus tanı ve teşhisinde kullanılan kan glukoz parametreleri (Saul ve ark., 2018).

	Aşikar DM	İzole BAG (**)	İzole BGT	BAG+BGT	Yüksek Riskli DM
APG (≥8 st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.st PG (75 g glukoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥200 mg/dl +DM semptomları	-	-	-	-
HbA1c (***)	≥%6.5 (≥48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)
(*) Venöz plazmada glisemi düzeyi glukoz oksidaz yöntemiyle 'mg/dl' olarak ölçülür. Aşikar DM tanısında dört tanı kriterinden herhangi biri yeterliyken, İzole BAG, İzole BGT ve BAG + BGT tanısı için her iki koşulun bulunması şarttır. (**) 2006 yılında WHO/IDF Raporundaki gibi, APG kesim noktasının 110 mg/dl, BAG 110-125 mg/dl değerleri şeklinde korunması benimsenmiştir. (***) Standardize metotlarla ölçülmelidir. DM: Diabetes mellitus, APG: 2. saatteki açlık plazma glukozu, PG: 2. saatteki plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, HbA1c: Glukozeillenmiş hemoglobin A1c, BGT: Bozulmuş glukoz toleransı, BAG: Bozulmuş açlık plazma glukozu.					

Hiperglisemi sürekli gelişen bir hastalık olup, açlık ve tokluk glisemi bozukluklarının farklı zaman dilimlerine sahip olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, diyabetik hastaların tanımlanmasında kullanılan tüm testler değişkenliğe tabidir (Saul ve ark., 2018).

2.2.1.2. Diyabetes Mellitus Sınıflandırması

Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'nin yaptığı 2017 yılı güncel kriter koşullarına göre diyabet dört temel kategoride sınıflandırılmıştır (American Diabetes, 2017).

Tip 1 diyabet (T1DM): Mutlak insülin yetmezliğiyle kendini gösteren beta hücre hasarı sonucu gelişir.

Tip 2 diyabet (T2DM): İnsülin direnci ya da ilerleyici bir insülin sekresyon bozukluğuyla tanımlanan diyabet formudur.

Gestasyonel diyabet: Gebelik öncesinde belli olmayan, ilk defa gebelikte tanı alan ve gebelik sırasında genellikle 2. ve 3. trimesterinde ortaya çıkan diyabet türüdür.

Diğer nedenlere bağlı diyabet tipleri: Genetik bozukluklar nedeniyle beta hücre disfonksiyonu, pankreas hastalıkları, immün sistem hastalıkları, ilaçlar, enfeksiyonlar veya kimyasallar gibi nedenlerle ortaya çıkabilen diyabet türüdür.

T1DM ve T2DM, klinikte başlangıç düzeyleri ve ilerleme süreçleri aynı olmayan hastalıklardır. Yukarıda belirtilen genel olarak kabul görmüş sınıflandırmalarla bazı olguların kesin tiplmesi yapılamamaktadır. Bundan dolayı 2015'de, ADA, Juvenil Avrupa Diyabet Derneği (EASD), Diyabet Araştırmaları Vakfı (JDRF) ile Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği (AACE)'nin katılım sağladığı sempozyumda etiyoloji temelli sınıflandırma kabul edilmiştir (TEMD, 13 Haziran 2018) (**Tablo 2.2**).

Tablo 2.2. Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması.

1-T1DM: Genellikle mutlak insülin eksikliğine neden olan otoimmün beta hücre yıkımı vardır. a. İmmün aracılı b. İdiyopatik	2-T2DM: İnsülin direnci zemininde progresif insülin sekresyon defektiyle karakterizedir.
3- Gestasyonel diyabet: Gebelik sırasında ortaya çıkan karbonhidrat intoleransı.	4-Diğer Nedenlere Bağlı Diyabet Tipleri: a. Beta hücre fonksiyonunun genetik bozuklukları b. İnsülin etkisindeki genetik bozukluklar c. Ekzokrin pankreasın doku hastalıkları d. Endokrinopatiler e. İlaç veya kimyasal maddelere bağlı diyabet f. İmmün ilişkili nadir diyabet formları g. Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar h. Enfeksiyonlar

2.2.1.3. Diyabetes Mellitus Semptomları ve Komplikasyonları

Diyabet hastalarında bilinen üç klasik semptom olarak, poliüri, polidipsi ve polifaji görülmektedir. Bu semptomlara ilaveten ağız kuruluğu, halsizlik, iştahsızlık ve noktüri de sık görülen belirtilerdendir. Bunların yanında diyabete bağlı açıklanamayan kilo kaybı, tekrarlayan inatçı enfeksiyonlar, bulanık görme ve deride kaşıntı daha az görülen belirtiler arasındadır (American Diabetes, 2009) **(Tablo 2.3).**

Tablo 2.3. Diyabetin semptomları.

Klasik Semptomlar	Daha Az Gözlenen Semptomlar
Poliüri, Polidipsi, Polifaji ya da iştahsızlık Halsizlik, çabuk yorulma Ağız kuruluğu Noktüri	Açıklanamayan kilo kaybı Bulanık Görme Tekrarlayan enfeksiyonlar Kaşıntı

Çok sayıda komplikasyon diyabetten kaynaklanmaktadır. Diyabet ve komplikasyonları, gerek önemli çevresel gerekse genetik bileşenleri olan karmaşık, çok faktörlü durumlardır. Diyabet, sırasıyla makrovasküler ve mikrovasküler sistemler olarak adlandırılan vücuttaki hem büyük hem de küçük kan damarlarında uzun vadeli hasarlar ile ilişkilidir (Cade, 2008). Koroner ve serebrovasküler arterler dahil olmak üzere makrovasküler sistemin hiperglisemi kaynaklı hasarı diyabetik bireylerde önde gelen ölüm nedeni olmasına rağmen, böbrek, göz ve sinirlerdeki mikrovasküler ağda hiperglisemi kaynaklı hasar çok daha yaygındır ve ayrıca mortalite üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Bu sistem hastalıklarına ilaveten diyabet komplikasyonları arasında erektil disfonksiyon, obezite, karaciğer yağlanması gibi hastalıklarda sıklıkla yer almaktadır (American Diabetes, 2009) (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Diyabetin komplikasyonları.

Akut Komplikasyonlar	Hipoglisemi	
	Diyabetik ketoasidoz	
Kronik Komplikasyonlar	Hiperozmolar hiperglisemik nonketotik koma (HHNK)	
	Makrovasküler	Koroner arter hastalığı Serebrovasküler hastalıklar Periferel vasküler hastalıklar
	Mikrovasküler	Retinopati Nefropati Nöropati Diyabetik ayak

Enjekte edilebilir insülin, insülin sekretagoları, insülin sensitizörleri ve oral hipoglisemik ajanlar gibi mevcut tedavilere rağmen, diyabetle ilişkili mortalite ve morbidite yüksek olmaya devam etmektedir. Ayrıca diyabet ve diyabet komplikasyonlarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılan ajanlar ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle, yeni terapötik müdahalelerin araştırılması gerekmektedir (Hermansen ve ark., 2008).

2.2.1.4. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)

T1DM, insülin üreten pankreas beta hücrelerinin yıkımıyla karakterize insülin sekresyon bozukluğu olup, otoimmün bir hastalıktır. T1DM'de, pankreas adacıklarındaki beta hücrelerinin aylar veya yıllar içinde otoimmün yıkımı vardır ve bu durum mutlak bir insülin eksikliğine neden olmaktadır (Simmons ve ark., 2015). T1DM'nin metabolik, genetik ve immünogenetik özelliklerinde ve yaşa bağlı farklılıklarda heterojenlik vardır. Bu hastalık her birey için kişiselleştirilmiş bir yaklaşım gerektirir (Jessica ve ark., 2022). İnsülin sekresyonunun kaybı hızlı veya kademeli olarak ortaya çıkabilir. Rezidüel insülin üretimi (tespit edilebilir/daha yüksek c-peptit), gençlik başlangıçlı T1DM'ye kıyasla erişkin başlangıçlılarda daha yaygınken, diyabetik ketoasidoz T1DM'li gençlerde

daha yaygındır (Maddaloni ve ark., 2022). T1DM'nin başarılı bir şekilde yönetilmesi, çoklu günlük insülin enjeksiyonları, insülin pompa tedavisi veya otomatik bir insülin verme sisteminin yanı sıra, tercihen sürekli bir glukoz monitörü (SGM) ile glukoz izlemeyi gerektirmektedir. SGM mevcut değilse, T1DM'li tüm kişilerde kılcal kan şekeri izleme (KKŞİ) ile gerçekleştirebilmektedir (Thomas ve ark., 2021). T1DM'nin kesin etiyolojisi hala bilinmemekle birlikte, araştırmacılar, spesifik HLA alelleri ile güçlü bir bağa sahip bir genetik yatkınlık olduğuna inanmaktadır. Bu ilişki, gençlik başlangıçlı T1DM'de erişkin başlangıçlı T1DM'ye kıyasla daha belirgindir. Çok sayıda gen kalıtıma katkıda bulunmaktadır (Noble ve ark., 2011).

T1DM, çocuklarda en sık görülen kronik hastalıklardan biridir ancak her yaşta da başlayabilmektedir. Yetişkinlerde ise yeni başlayan T1DM, T2DM olarak yanlış teşhis edilebilmekte olup, genç yaşta başlayan T1DM'den daha yaygındır. T1DM insidansı ve prevalansında, diyabetli kişilerin yaklaşık %5 ila %10'unu temsil eden istikrarlı bir artış olmuştur (Imperatore ve ark., 2018). Sistemik gözden geçirme ve meta-analiz çalışmaları, dünya çapında T1DM prevalansının %9,5 olduğunu ve insidansın 100.000 kişide 15 olduğunu rapor etmiştir. Dünya çapındaki insidansla önemli bir coğrafi farklılık vardır. Bildirilen en yüksek insidansların Finlandiya ve diğer Kuzey Avrupa ülkelerine ait olduğu ve bu oranların, bildirilen insidansın en düşük olduğu Çin ve Venezuela'da görülenlerden yaklaşık 400 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Mobasseri ve ark., 2020) (**Tablo 2.5**).

Tablo 2.5. T1DM'yi T2DM'den ayıran özellikler.

Klinik Özellikler	T1DM	T2DM
Başlangıç Yaşı	Genellikle ≤ 30 Yaş	Genellikle ≥ 30 Yaş
Başlangıç Şekli	Akut, Semptomatik	Yavaş, Asemptomatik
Ketozis	✓	X
Başlangıç Kilosu	Genellikle Zayıf	Fazla Kilolu/Obez
Ailede Diyabet Yüğü	X	Yoğun
C-peptid	Düşük	Normal/Yüksek/Düşük
Otoantikörler	+	-
Otoimmün Hastalık Birlikteliğı	✓	X

T1DM patogenezi, pankreatik adacıkları etkileyen kronik bir enflamatuvar sızıntının varlığı ile başlamaktadır. Başka bir varsayım da uzun süredir hastalığı olan bireylerde pankreasın insülin üreten hücrelerden yoksun olduğu ve geri kalan beta hücrelerinin yenilenemeyeceğidir (In't Veld, 2011). Bu konuyla ilişkili veriler, uzun süredir devam eden T1DM'li hastaların çoğunda az sayıda beta hücresi olmasına rağmen, bebeklerde ve çok küçük çocuklarda beta hücre rejenerasyonuna dair kanıtlar olduğunu (ancak ergenlerde veya yetişkinlerde değil) göstermektedir (Lam ve ark., 2017). T1DM ilişkili raporların çoğu, bu bozukluğu olan hastalardan alınan pankreas numuneleri, serum ve periferik kan lenfositlerinin analizinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşenlerle ilgili araştırmalar, kemik iliğı, timus, bağışıklık sistemi ve beta hücrelerindeki bir dizi fonksiyonel hasarın, T1DM patofizyolojisine toplu olarak katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Atkinson ve ark., 2014) (**Tablo 2.5**).

2.2.1.5. Streptozotosin (STZ)

T1DM modelinin hayvanlar üzerinde oluşturulmasında, pankreatik beta hücre yıkımına neden olan yaygın bir antibiyotik olan streptozotosin (STZ) kullanılmaktadır (Lenzen, 2008; Wu ve ark., 2015). Streptozotosin ilk olarak 1960 yılında *Streptomyces*

achromogenes'den izole edilmiş olup diyabetojenik özellikleri 1963'e kadar tanımlanmamıştır (Rakieten ve ark., 1963). Bu diyabetojenik etkilerinin pankreatik beta hücrelerinin yıkımından kaynaklandığı 1969 yılında keşfedilmiştir (Junod ve ark., 1969). Farelerde ve sıçanlarda STZ kaynaklı T1DM uygulaması ile insülin eksikliği ve hiperglisemi meydana getirilebilmektedir (Furman, 2021). Fare, sıçan ve maymun dahil olmak üzere birçok hayvan türü, STZ'nin pankreatik beta hücresi üzerindeki sitotoksik etkilerine karşı hassastır. Bu yüzden şu anda, STZ sıçan ve farelerde diyabeti indüklemek için en sık olarak kullanılan bir ajandır (Lazar ve ark., 1968). Hayvanlar üzerinde STZ enjeksiyonu, düşük dozlarda tekrarlamalı olarak ya da tek bir yüksek doz kullanımı şeklinde uygulanmaktadır (Furman, 2021).

2.2.2. T1DM ve Erkek Üreme Biyolojisi İlişkisi

T1DM erkekler arasında daha yaygındır. Hastaların çoğuna 30 yaşından önce tanı konulmaktadır (Othman ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, erkek üreme fonksiyonlarının diyabetten olumsuz etkilendiğini ve diyabetik hastalarda erkek infertilite sıklığının sağlıklı kişilere kıyasla 5-10 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (Dkhil ve ark., 2016). Diyabetik üreme bozuklukları, testislerde dejeneratif değişiklikleri, Sertoli hücrelerinde bozulmuş glukoz homeostazını, androjen biyosentezini ve salgılanmasını içermektedir (Alves ve ark., 2013; Jangir ve ark., 2014). Çalışmalarda, diyabetik olmayan erkeklere kıyasla diyabetik hastalarda daha düşük serum testosteron seviyeleri rapor edilmiştir (Ding E. L. ve ark., 2006; Afifi ve ark., 2015). Testosteron düzeyindeki azalma, diyabette germ hücre apoptozu ve anormal spermatogenez ile sonuçlanmaktadır (Shubhada ve ark., 1993; Ge ve ark., 2008). Ayrıca T1DM'ye erektil disfonksiyon, düşük semen kalitesi ve azalmış cinsel isteksizlik de eşlik etmektedir (Al-Megrin ve ark., 2020). Diyabetle ilişkili cinsel işlev bozukluğu, gerek tip 1 gerekse tip 2 diyabet tanısı almış erkeklerde ve hayvanlarda gösterilen yaygın sekonder komplikasyon olarak kabul edilmiştir (Agbaje ve ark., 2007; Ding G. L. ve ark., 2015). Birçok çalışma, diyabetin sperm kalitesi üzerindeki zararlı etkisinin, diyabetik erkeklerin kadın partnerlerinde gebelik oranını azaltabileceğini doğrulamıştır (Adeniyi ve ark., 2010; Loeken, 2012; Oridupa ve ark., 2017). Diyabetik durumda yaşanan erkek üreme işlev bozukluklarına, hipotalamik-hipofizer-gonadal eksenindeki bozuklukların yanı sıra serbest radikallerin aşırı

üretimi ve oksidatif stresin artması da katkı sağlamaktadır (Jangir ve ark., 2014; Schoeller ve ark., 2014).

Diyabetik hastalardan alınan sperm örneklerinde nüklear ve mitokondriyal DNA'da yapısal hasarlar bulunmaktadır. Sperm DNA hasarının hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres ve artan glikasyondan kaynaklandığı ve dolayısıyla daha düşük implantasyon oranlarına, azalan embriyo kalitesine ve bazı çocukluk hastalıklarının başlangıcına yol açtığı bilinmektedir (Lewis ve ark., 2005; Agbaje ve ark., 2008; Chandel ve ark., 2008). Diyabet ile ilişkili oksidatif hasar, mitokondriyal elektron transferinin yok edilmesi ve enzimatik olmayan ürünlerin oluşumu ile indüklenir (Al-Quraishy ve ark., 2015). Semendeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) varlığı, oksidatif stres ve fertilité üzerindeki olumsuz etkisinin klinik kanıtıdır (Yigitturk ve ark., 2017). Oksidatif hasar nedeniyle, ROS lipid moleküllerine saldırır, doku hasarına ve sperm DNA parçalanmasına neden olur. Testis hasarı androjen biyosentez düzeylerini etkiler; bu nedenle üreme biyolojisini dolaylı olarak bozabilir (Tan ve ark., 2014).

T1DM ve testis hasarı ilişkili literatür bilgisi değerlendirildiğinde, T1DM ve T2DM'nin LH, FSH ve testosteron düzeyleri üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, T1DM gruplarında testosteron düzeyinin %88 oranında azaldığı ve boş seminifer tübül miktarının arttığı gösterilmiştir (Barsiah ve ark., 2019). T1DM'li fare modeli oluşturulan bir diğer çalışmada, diyabetik farelerin testis ağırlıklarında %30 azalma olduğu ve artan testis disfonksiyonu gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca seminifer tübül çaplarının kontrol gruplarına göre diyabetik hayvanlarda önemli düzeyde azaldığı ve spermatogenik hücre kaybının arttığı da vurgulanmıştır (Maresch ve ark., 2017). Benzer şekilde fareler üzerinde T1DM oluşturulan farklı bir çalışmada, diyabetin testis yapısında bozulmaya ve testosteron sekresyonunda azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Das ve ark., 2021). Ellagik asitin koruyucu etkisini değerlendiren sıçanlar üzerinde T1DM modelinin oluşturulduğu başka bir çalışmada, diyabetik sıçan testislerinde ROS ve MDA düzeylerinin yüksek olduğu, Bax ve aktif kaspaz-3 ekspresyonlarının arttığı ve Bcl-2 protein ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (JZ ve ark., 2021). Bu çalışmada diyabetin oksidatif stresi ve apoptozu uyatarak testis hasarını indüklediği, testis ağırlıklarını düşürdüğü, sperm sayısını ve kalitesini bozduğu da belirtilmiştir (JZ ve ark., 2021). Bu çalışma sonuçlarına benzer olarak yeni yayınlanan ve Spermidin'in koruyucu etkisini

T1DM C57BL/6J fareler üzerinde araştıran bir çalışmada ise, testis ağırlığının yanı sıra sperm sayısının azaldığı, sperm morfolojik bozukluk oranının ise önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Wang J. Y. ve ark., 2022b). Diyabetik hayvanlarda seminifer tübül alanı ve çapının azaldığı, Bax protein ekspresyonunun arttığı ve Bcl-2 protein ekspresyonunun azaldığı da bu çalışma bulgularında raporlanmıştır (Wang J. Y. ve ark., 2022b).

2.3. Probiyotikler

2.3.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi

Etimolojik olarak probiyotik terimi, "yaşam için" anlamına gelen Yunanca'dan türetilmiştir. Probiyotiklerin tanımı, zaman içinde, canlı bakteri takviyelerinin kullanımına artan ilgi ve bunların etki mekanizmalarının anlaşılmasında kaydedilen ilerleme ile eş zamanlı olarak gelişmiştir (Kechagia ve ark., 2013). Terim başlangıçta bir mikroorganizma tarafından üretilen ve diğerlerinin büyümesini uyaran maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Daha sonra mikrobiyal büyümeyi uyaran doku ekstraktları ve bağırsak florası dengesine katkıda bulunan, hayvanlar üzerinde yararlı bir etki gösteren hayvan yemi takviyelerini tanımlamak için kullanılmıştır (Hamilton-Miller, 1999). Yakın zamana kadar probiyotik kavramının gelişimine çeşitli şekillerde katkıda bulunan en yaygın kullanılan Fuller'e ait tanım "probiyotikler, mikrobiyal dengeyi iyileştirerek konakçı hayvanı faydalı bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal yem takviyeleridir" olarak kabul edilmiştir (Fuller ve ark., 1999). Şu anda kullanılan tanım ise, Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü Gıda ve Tarım Örgütü tarafından verilmiş olup, buna göre probiyotikler, "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak yeniden tanımlanmıştır (FAO/DSÖ, 2001).

Probiyotiklerin modern tarihi, 1900'lerin başında Paris'teki Pasteur Enstitüsü'nde çalışan, geleceğin Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff'un öncü çalışmalarıyla başlamıştır. Louis Pasteur, fermantasyon sürecinden sorumlu mikroorganizmaları tespit ederken, Metchnikoff ilk önce bu mikropların insan sağlığı üzerindeki olası etkilerini bulmaya çalışmış ve kırsal halkın uzun ömürlülüğünü yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin düzenli tüketimine bağlamıştır. Metchnikoff laktik asit bakterilerinin (LAB) bağırsak otointoksikasyonuna karşı bir tür koruma sağladığını öne sürmüştür. Bağırsak

hastalıklarını iyileştirmek için yararlı mikroplar ile zararlı mikropların ikame edilebileceğini tespit eden araştırmasıyla 1908 yılında tıp alanında Nobel Ödülü almıştır. Günümüzdeki probiyotik kavramının temelini bu hipotez oluşturmuştur. Daha sonra 27 yaşındaki Bulgar doktor Stamen Grigorov laktobasillerin, hastalığa ve yaşlanmaya katkıda bulunan gastrointestinal metabolizmanın çürütücü etkilerine karşı koyabileceğini öne sürmüştür. Üstelik Hipokrat tarafından 2000 yıl önce "ölümün bağırsaklarda oturduğunu" ve "kötü sindirimin tüm kötülüklerin anası olduğunu" belirtilmiştir. Bununla birlikte probiyotiklerin tarihi, fermente gıdaların kullanımı ile yakından ilgili olduğu için insanlık tarihi kadar eskidir. MÖ. 2000 ve 3000 yıllarına ait ikonografik ve yazılı kanıtlar Hindu, Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalıların fermente süt ürünlerini kullandığını göstermiştir (Gasbarrini ve ark., 2016).

İnsanların bağırsak sistemi, karmaşık mikroorganizmaların bulunduğu bir ekosistemi içermektedir. Gastrointestinal sistemde bulunan 400'den fazla bakteri türünün, kolonik materyalin ağırlığının yarısı bakteriyel hücrelerden oluşmaktadır. Kalın bağırsaktaki yüksek bakteri popülasyonu 10^{12} kob (koloni oluşturan birim/g) miktarına ulaşmaktadır (Thursby ve ark., 2017). İnce bağırsakta ise bakteri içeriği sadece 10^4 ile 10^8 kob/g miktarında olup oldukça düşüktür. Mide suyunun pH'ının düşük olması nedeniyle, sadece 10^1 ile 10^3 kob/ml miktarında bakteri bulunmaktadır (Han ve ark., 2021).

2.3.1.2. Probiyotik Olarak Tanımlanan Mikroorganizmalar

Tanımları dikkate alındığında, probiyotik özellikler sergileyebilen mikrobiyal türlerin sayısı etkileyicidir. Beslenme söz konusu olduğunda, yalnızca laktik asit bakterileri olarak sınıflandırılan suşlar önemlidir ve bunların arasında uygulamalı bağlamda en önemli özelliklere sahip olanlar, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait olanlardır. Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermentasyonunun ana son ürünü olarak laktik asit üretebilen gram pozitif, katalaz negatif bakteri türleridir. En önemli temsilcilerinden bazıları aşağıda listelenmiştir (Kechagia ve ark., 2013) (**Tablo 2.6**).

Tablo 2.6. Probiyotik olarak tanımlanan mikroorganizmalar (Kechagia ve ark., 2013). LAB: Laktik asit bakterileri.

<i>Lactobacillus</i> Türleri	<i>Bifidobacterium</i> Türleri	Diğer LAB Bakterileri	LAB Grubuna Dahil Olmayan Bakteriler
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. sporogenes</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.3.1.3. Probiyotiklerin Özellikleri ve Seçilme Kriterleri

Araştırılan bu mikroorganizmaların probiyotik olarak belirlenmesi ve özellikle probiyotik endüstrisinde kullanılabilmesi için sağlanması gereken kriterler bulunmaktadır (Fijan, 2014). Probiyotik olarak kullanılacak suşun en önemli özelliklerinden birisi, güvenli görülmesi ve insan sağlığı için faydalı etkiler oluşturmalarıdır (Fijan, 2014). Örneğin insan kullanımına yönelik ideal bir probiyotik suş, prebiyotikleri fermente edebilmeli ve insan kaynaklı olmalıdır. Konakçıda toksik, patojenik, mutajenik ve kanserojenik olmamalıdır (Hardy ve ark., 2013). İnsan bağırsak epitel hücrelerine bağlanmalı, kolonize olabilmeli, enflamatuvar etkileri olmamalı ve immün uyarımı destekleyebilmelidir. Yeterli miktarda hayatta kalabilmesi için, mide ve ince bağırsaktan geçiş sırasında asidik ve alkali koşullara, lizozim gibi enzimlere ve toksik metabolitlere karşı dayanıklı olması gerekmektedir (Hardy ve ark., 2013). Çok iyi üreme özelliklerine sahip olup, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddeleri üretebilmeli ve patojenler için antagonistik olmalıdır. Antibiyotik direnci açısından, plazmid transfer mekanizması olmamalı ve

genetik olarak stabil olmalıdır (Darbandi ve ark., 2022). Ayrıca işleme ve depolama sırasındaki probiyotiklerin yaşama kabiliyetlerinin sürdürülmesi, ürünlerde uygulama kolaylığı ve gıdanın işlenme koşullarına direnç göstermesi gibi özellikleri de sunmalıdır (Darbandi ve ark., 2022).

İnsan çalışmalarında ürünün gram başına koloni oluşturan birim önemli bir parametredir (Kechagia ve ark., 2013). Minimum etkili konsantrasyonlar hakkındaki bilgiler halen yetersiz olsa da probiyotik ürünlerin minimum 10^6 CFU/mL veya gram konsantrasyonuna sahip olması ve günlük toplam 10^8 ile 10^9 probiyotik mikroorganizmanın tüketilmesi gerektiği kabul edilmektedir (Kechagia ve ark., 2013). Ayrıca, suşlar üretim ve ticari koşullar altında gelişebilmeli ve normal saklama koşulları altında canlılığını sürdürebilmelidir (Kechagia ve ark., 2013). Bununla birlikte bazı araştırmalar, canlılığın tüm probiyotik etkiler için gerekli olmadığını belirtmektedir (Nazir ve ark., 2018). Çünkü, tüm mekanizmaların veya klinik faydaların canlılıkla doğrudan ilişkili olmadığı ve hatta bazı probiyotik DNA üzerindeki hücre duvarı bileşenlerinin bile önemli sağlık etkileri olabileceği rapor edilmiştir. Bu nedenle, bazı probiyotik suşlar için ilk üretim adımları sırasında optimal büyüme yeterli olabilir ve depolama sırasında çok iyi bir şekilde canlılığı korumaları gerekmeyebilir (Nazir ve ark., 2018).

2.3.1.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Probiyotiklerin temel etki mekanizmalarının nasıl çalıştığı konusu bugün halen tartışmalıdır. Bu kapsamda moleküler mekanizmaların önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir (Plaza-Diaz ve ark., 2019). Probiyotiklerin moleküler mekanizmaları hakkındaki birçok hipotez, deneysel verilerle desteklenmektedir. Özellikle probiyotiklerin hücre yüzey molekülleri ve hücre dışı komponentleri, konakçıda gösterdiği etkileri bakımından çalışılmaktadır (Plaza-Diaz ve ark., 2019).

Probiyotiklerin konakçıyı intestinal sistem rahatsızlıklarından nasıl koruduğunu araştıran bir dizi mekanizma bulunmaktadır (Hemarajata ve ark., 2013). Probiyotikler etkilerini genellikle bağırsak mikrobiyotasını etkileyebilecekleri gastrointestinal kanalda gösterirler. Probiyotikler, başlangıçtaki mikrobiyota, probiyotik suş ve gastrointestinal sistem bölgesine bağlı olarak, insan bağırsağı mukozasını geçici olarak kolonize

edebilmektedir (Hemarajata ve ark., 2013). Ayrıca probiyotikler spesifik olmayan ve türe özgü mekanizmalarla sağlık etkileri gösterirler. Spesifik olmayan mekanizmalar, yaygın olarak kullanılan probiyotik takviyelerin suşları, türleri ve hatta cinsleri arasında büyük farklılıklar mevcuttur. Bu mekanizmalar, kolonizasyon direncini artırarak, bağırsak geçişini iyileştirerek veya bozulmuş bir mikrobiyotayı normalleştirmeye yardımcı olarak gastrointestinal sistemdeki patojenik mikroorganizmaların büyümesinin engellenmesini, biyoaktif metabolitlerin üretimini (örn., kısa zincirli yağ asitleri) ve lümen pH'nın azalmasını içermektedir (WGO, 2017; Davani-Davari ve ark., 2019). Türe özgü mekanizmalar arasında vitamin sentezi, bağırsak bariyeri takviyesi, safra tuzu metabolizması, enzimatik aktivite ve toksin nötralizasyonu yer alabilir. Nadir olan ve belirli bir türün yalnızca birkaç suşu tarafından kullanılan suşa özgü mekanizmalar arasında sitokin üretimi, immünomodülasyon, endokrin ve sinir sistemleri üzerindeki etkiler de gözlenebilmektedir (Sanders, 2015; WGO, 2017).

Probiyotiklerin etki mekanizmaları aşağıda sunulmuştur;

1. İnhibe edici maddelerin üretimini sağlarlar: Probiyotikler, gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı etkili olan birçok madde üretirler. Bunlar arasında organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler bulunduğu bilinmektedir.
2. Tutunma bölgelerini bloke ederler: Probiyotikler patojenlerle rekabet ederler ve patojenlerin bağırsak yolunu kolonize etmesini önlerler.
3. Besin maddeleri için rekabet oluştururlar: Probiyotikler patojenlerin intestinal sistemde uzun süre bulunmasını engellemek için gerekli tüm besin maddelerini tüketirler. Ancak bu mekanizmayı kanıtlamak için *in vivo* verilere ihtiyaç duyulmaktadır.
4. Bağışıklık sistemini güçlendirmeye etki ederler: Son araştırmalar, probiyotiklerin bağışıklık sistemini güçlendirerek konağı bağırsak hastalıklarına karşı koruduğunu göstermiştir. Mekanizma tam olarak anlaşılamamakla birlikte, hücre duvarı bileşenlerinin veya hücre yüzeylerinin destekleyici etki gösterdiği ve humoral bağışıklık tepkisini arttırdığı düşünülmektedir (Nagpal ve ark., 2012).

2.3.1.5. Probiyotiklerin Klinik Önemi ve Potansiyel Uygulamaları

Klinik sağlık yararları için probiyotiklerin kullanımı, günümüzün henüz çok fazla keşfetmediği büyüleyici bir araştırma alanıdır. Probiyotiklerin anti-patojenite, anti-diyabetik, anti-obezite, anti-enflamatuar, anti-kanser, anti-alerjik ve anjiyojenik aktiviteler gibi bazı seçkin özellikleri sıklıkla çalışılmaktadır (Kerry ve ark., 2018). Bağırsak sağlığının iyileştirilmesi, bağışıklık tepkisinin artırılması, serum kolesterolünün düşürülmesi ve kanserin önlenmesi dahil olmak üzere probiyotiklere atfedilen faydalı etkiler her geçen gün artmaktadır. Bu özellikleri türe özgüdür ve çeşitli mekanizmalardan etkilenmektedir (Nagpal ve ark., 2012) (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. Probiyotik bakterilerin sağlığa faydaları ve ilgili mekanizmaları (Nagpal ve ark., 2012).

Sağlık Yararları	Önerilen Mekanizmalar
Enterik patojenlere karşı direnç	Sistemik immün etki, kolonizasyon direnci enterik patojenlerin (pH, bakteriyosinler, antimikrobiyal peptidler, laktik asit üretimi ve toksik oksijen metabolitleri) erişimini sınırlama
Laktoz sindirimine yardım	Bakteriyel laktaz, ince bağırsakta laktoz üzerinde etkili
İnce bağırsakta aşırı bakteri üremesi	Lactobacillus suşlarının toksik metabolit üretimini azaltması
Bağışıklık sistemi modülasyonu	Savunmanın güçlendirilmesi, Th1/Th2 hücrelerin düzenlenmesi, antiinflamatuar üretimi
Alerji	Kan dolaşımına antijen translokasyonunun önlenmesi
Kan lipidleri, kalp hastalığı	Kolesterolün bakteri hücresi tarafından özümsemesi
Antihipertansif etki	Süt proteini üzerindeki bakteriyel peptidaz etkisi
Ürogenital enfeksiyonlar	Üriner ve vajinal sistem hücrelerine yapışma, rekabetçi dışlama, inhibitör üretimi
Hepatik ensefalopati	Üreaz üreten bağırsak florasının rekabetçi dışlanması veya inhibisyonu
T1DM	Mukoza bariyer fonksiyonunun geliştirilmesi
Crohn hastalığı	Proinflamatuar sitokinlerde azalma, intraepitelyal lenfositler arasında TNF-alfa ve CD4 hücrelerinde azalma

2.3.1.6. Probiyotiklerin Antidiyabetik Etkileri

Güneydoğu Asya Uluslararası Diyabet Federasyonu'na (IDF) göre, dünya çapında 425 milyon insan diyabet hastasıdır. Bu sayının 2045 yılına kadar 629 milyona çıkması beklenmektedir (IDF, 2015). Bu bozukluğun yönetimi, diyabet için kesin bir tedavi

olmamasına rağmen, birden fazla ilaç içermektedir. Bununla birlikte, araştırmacılar, bu bozukluğu iyileştirmede probiyotiklerin önemini anlamada büyük ölçekli 16S rRNA gen dizilimine, kantitatif gerçek zamanlı PCR'a dayanarak ilerleme kaydetmişlerdir (Corb Aron ve ark., 2021). T1DM gibi otoimmün hastalıkların gelişiminde oksidatif strese dirençli ve aynı anda sülfatları indirgeme ve bütirat üreten bakterilerin büyümesini inhibe etme yeteneğine sahip olan fırsatçı patojenlerin istilası artmıştır (Yu ve ark., 2021). T1DM'li çoğu hasta bağırsağında daha yüksek miktarda *Veillonella*, *Clostridium* ve *Bacteriodes* popülasyonunun bulunduğu, sağlıklı kişilerde ise *Prevotella*, *Blautiacoccoides/Eubacterium rectale* grubu, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* popülasyonlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Jandhyala ve ark., 2015; Zhang Y. J. ve ark., 2015) (**Tablo 2.8**). Gastrik inhibitör polipeptid ve glukagon benzeri peptid-1 gibi bağırsak hormonlarının probiyotik müdahaleler yoluyla modüle edilmesi, diyabetin yönetilmesinde önemli bir stratejidir (Khalili ve ark., 2019). Bu bağlamda hormonlar, periferik insülin direncinin veya beta hücrelerinin insülin üretememesinin neden olduğu bozukluğun nötralize edilmesiyle sonuçlanan glukoz homeostazında gizli bir rol oynamaktadır (Khalili ve ark., 2019).

Tablo 2.8. T1DM patogenezinde azalan ve artan suşlar (Jandhyala ve ark., 2015; Zhang Y. J. ve ark., 2015).

Hastalık	Model	Disbiyozis
T1DM	İnsan	↓<i>Lactobacillus</i> ↓<i>Bifidobacterium</i> ↓<i>Blautia coccoides</i> ↓<i>Eubacterium rectal</i> ↓<i>Prevotella</i> ↑<i>Clostridium</i> ↑<i>Bacteroides</i> ↑<i>Veillonella</i>

2.3.2. Paraprobiyotiklerin Tanımı ve Özellikleri

Paraprobiyotikler, özellikle tüketiciye sağlık açısından fayda sağlayan inaktive edilmiş mikrobiyal hücreler (cansız) veya fantom probiyotikler olarak isimlendirilmektedir (Siciliano ve ark., 2021). DNA iplikçik kırılması, hücre zarının bozulması gibi mikrobiyal hücre yapılarını değiştiren faktörlere maruz kaldıktan sonra canlılığını tamamen kaybetmiş hücre fraksiyonlarıdır ve böylece tüketicinin sağlığına fayda sağlamaktadırlar. Bu bileşenlerin probiyotiklere göre üretim avantajları vardır çünkü hücre canlılığı gerekli değildir. Bu özelliği sayesinde paraprobiyotikler özellikle gıda sektöründe teknolojik gelişme ve uygulamaları daha elverişli hale getirmektedir (Monteiro ve ark., 2023). Paraprobiyotikler, adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sistemlerini düzenleme yeteneğine ve anti-inflamatuar, antiproliferatif ve antioksidan özelliklere sahiptir. Böylece patojenlere karşı antagonistik etki gösterebilirler. Dahası, paraprobiyotiklerin bağışıklığı zayıf olan kişiler ve yaşlılar için uygun ürünlerde de kullanılabilmesi, inaktive edilmiş cansız hücrelerin avantajlarından (Oh ve ark., 2019).

Canlı mikroorganizmaların uygulanmasıyla ilgili dezavantajlar, canlı olmayan probiyotik preparatlara ilgi duyulmasına yol açmıştır (Nataraj ve ark., 2020). Paraprobiyotik etkinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala kapsamlı olarak araştırılrsa da çalışmalar, probiyotiklere benzer şekilde hücre yüzeyinde bulunan moleküllerin (peptidoglikan, teikoik asit, hücre duvarı polisakkaritleri, hücre yüzeyiyle ilişkili proteinler vb.) paraprobiyotikler ve konakçı arasındaki ilk etkileşim hattı olduğunu ve böylece faydalı etkilere aracılık ettiğini göstermektedir (Teame ve ark., 2020). Probiyotik hücrelerin inaktivasyonu, hücre yapısını tamamen bozmadan, mikrobiyal hücre bileşenlerini (hücre zarları ve zarfları, proteinler, DNA vb.) ve fizyolojik fonksiyonları (enzim aktiviteleri ve membran seçiciliği) değiştirebilen fiziksel veya kimyasal işlemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Paraprobiyotiklerin üretimine yönelik geleneksel ve yeni gelişen teknolojiler arasında ısı işlemler, UV ışınları, yüksek basınç ve ultrason gibi uygulamalar bakteriyel inaktivasyon için sıklıkla laboratuvar ortamlarında kullanılmaktadır (Zhang L. ve ark., 2005; Ananta ve ark., 2009; Shin ve ark., 2010; Ou ve ark., 2011).

2.3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB), laktik asit üretmek için karbonhidratları fermente edebilen bir tür gram pozitif mikroorganizmadır ve şu anda fermente gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang Y. ve ark., 2021). Laktik asit bakterileri genellikle kok veya çubuktur ve düşük pH'a karşı güçlü bir toleransa sahiptir. LAB bakteri grubunda 6 familya, 38 cins vardır ve hepsi *Lactobacillales* takımına, *Bacilli* sınıfına ve *Firmicutes* filumuna aittir (Agriopoulou ve ark., 2020). Son yıllarda laktik asit bakterilerinin gıda endüstrisindeki mükemmel rolü, probiyotik fonksiyonları ve mikrobiyal metabolik özellikleri de daha fazla dikkat çekmektedir. Bu bakteriler 60'tan fazla tür içermesine rağmen, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoccus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* türleri gıda fermentasyonunda sıklıkla tercih edilmektedir (Wang Y. ve ark., 2021). Laktik asit bakterileri, sindirilemeyen polisakkaridlerin bozunması ve istenmeyen aroma maddelerinin dönüşümü dahil olmak üzere gıdadaki makromoleküler maddeleri parçalayabilmektedir. Bu arada metabolizma sırasında kısa zincirli yağ asitleri, aminler, bakteriyosinler, vitaminler ve ekzopolisakkaridler gibi çeşitli ürünler de üretmektedirler (Wang Y. ve ark., 2021). Yukarıda belirtilen metabolik özelliklere dayalı olarak, laktik asit bakterileri, gıda endüstrisinde çeşitli genişletilmiş uygulamalar göstermektedir. Bir taraftan, fermente gıdaların lezzetini iyileştirmek, gıdaların besleyiciliğini arttırmak, zararlı maddeleri azaltmak, raf ömrünü uzatmak vb. amaçlarla kullanılmaktadırlar. Diğer taraftan da, vücutta sağlığı geliştirmek için probiyotik olarak kullanılmaktadırlar (Wang Y. ve ark., 2021). LAB bakterilerinin genel özellikleri özetlenirse; polisakkarit, protein ve aminoasit gibi makromoleküllerin bozunmasında, zararlı maddelerin gıdaya dönüştürülmesinde, antimikrobiyal bileşiklerin üretiminde, mitotoksijenik mantarlara karşı antifungal aktivitenin oluşturulmasında ve probiyotik kaynağı olarak kullanımda yaygın rollere sahip oldukları bilinmektedir (Wang Y. ve ark., 2021).

2.3.2.2. *Lactobacillus Rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus daha önce *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* olarak olarak bilinmekteydi. Bu bakteri fakültatif heterofermentatif bir bakteridir ve hücreler tek tek ya da çubuk şeklindedir. *Lactobacillus rhamnosus* %45-47 oranında G+C içeriğine (%mol) ve lizin-d-aspartil tipi peptidoglikana sahiptir. Ayrıca bu bakteri cinsleri hem 15 hem de 45°C'de büyüebilmekte ve laktik asit izomerlerini üretebilmektedir. Arabinoz, selobiyoz, eskülin, riboz, sorbitol ve sükroz gibi karbonhidratları bu bakteriler fermente etmektedir (İbrahim, 2016).

Lactobacillus rhamnosus GG (ATC53103) (LGG) suşu bu ailenin bir üyesi olup, üzerinde en çok çalışılan ve yaygın olarak kullanılan probiyotik kültürlerden biridir. LGG, orijinal olarak Sherwood Gorbach ve Barry Goldwin tarafından sağlıklı bir yetişkinin dışkı örneklerinden izole edilmiş ve 1989'da patenti alınan ilk tür olarak sağlık yararları sağlayabileceği düşüncesiyle hızla ticarileştirilmiştir (Goldin ve ark., 1992). Asit ve safraya karşı direnci, oksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri ve bağırsak epitel tabakasına yapışma kapasitesi nedeniyle potansiyel bir probiyotik suş olarak tanımlanmıştır (Doron ve ark., 2005). Konakçı etkileşimleri için önemli faktörler olarak tanımlanan moleküller, yapışkan pili veya fimbriyaları, lipoteikoik asit molekülleri, ana salgılanan proteinleri ve galaktoz açısından zengin ekzopolisakkaritlerinin yanı sıra spesifik DNA motiflerini içermektedirler (Lebeer ve ark., 2012). Literatürde 900'den fazla yayımla, öncelikle bağırsak sağlığı için en çok araştırılan probiyotik tür haline gelmiştir (Westerik ve ark., 2018).

2.3.2.3. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ve T1DM İlişkisi

Bağırsak mikrobiyotasının bozulması, disbiyozis olarak tanımlanır. Disbiyozisin doğrudan veya dolaylı olarak birçok hastalık ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Zhang Y. J. ve ark., 2015). Çalışmalar, bağırsak mikrobiyotası ve T1DM arasında bir bağlantı olduğunu da rapor etmiştir (Calabrese ve ark., 2020). İnsanlarda ve hayvanlarda rastlanan hastalıkların engellenmesi amacıyla LGG dahil olmak üzere birçok *Lactobacillus* çeşidi ve suşu ile kapsamlı bir biçimde çalışılmaktadır (Azad ve ark., 2018). Özellikle probiyotikler içerisinde *Lactobacillus* alt türlerinin uygulanmasının, hayvan deneylerinde ve klinik deneylerde kan şekeri, HbA1c, insülin direnci ve oksidatif stres

seviyesini azaltarak diyabetin başlamasını önleyebileceğini veya geciktirebileceğini gösterilmiştir (Yan ve ark., 2019).

T1DM hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan araştırmalar, probiyotik takviyesinin pankreasın beta hücrelerine zarar vermekten sorumlu proinflamatuvar sitokinlerin azalmasına, bağırsak bariyer fonksiyonunun iyileşmesine ve bağışıklık toleransının indüklenmesine yol açtığını göstermiştir (Kumar ve ark., 2021). Konak immün hücreleri ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki bağlantı da T1DM'nin patogenezi etkileyebilmektedir. Ayrıca bağırsak mikrobiyotası tarafından salgılanan metabolitler, bağışıklık tepkisini düzenleyebilir ve T1DM sürecinin gelişimini yavaşlatabilir (Drexhage ve ark., 2016; Knip ve ark., 2017). Başka bir deyişle, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu, T1DM'nin patogenezi tetikleyebilmekte ve hızlandırabilmektedir. Bu nedenle probiyotikler, T1DM'nin potansiyel bir düzenleyicisi olarak, bağırsak mikrobiyota-bağışıklık aksı yoluyla hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya yardımcı olmaktadır (Mishra ve ark., 2019).

En kapsamlı şekilde incelenen probiyotik suş olan *LGG*'nin diyabetik hayvan modellerinde anti-hiperglisemik etki göstererek glukoz toleransını iyileştirdiği belirtilmiştir (Park ve ark., 2015). Ek olarak çalışmalar, *LGG*'nin kontrol grubuna kıyasla STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kan glukozu ve HbA1c düzeylerini azaltabileceğini ve insülin duyarlılığını arttırabileceğini göstermiştir (Tabuchi ve ark., 2003). Yüksek yağlı/yüksek fruktozlu diyet ve aralıklı hipoksiye maruz kalmanın (HFDIH), insülin direnci, T2DM gibi metabolik bozukluklara neden olduğunu belirten fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, *LGG*'nin HFDIH kaynaklı metabolik disfonksiyon üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır (Liu ve ark., 2020). Bu çalışmada *LGG* tedavisi ile yağ kütlesi, enerji tüketimi, glukoz intoleransı, insülin direnci ve karaciğer hasarı da dahil olmak üzere metabolik parametre indekslerinde iyileşme olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2020). *LGG* ile fermente edilmiş havuç suyunun T2DM üzerindeki etkisi araştıran farklı bir çalışmada ise *LGG* takviyesinin, diyabetik sıçanlarda kan şekerini, insülini, antioksidan kapasitesini ve pankreas morfolojisini olumlu şekilde düzenlediği gösterilmiştir (Hu ve ark., 2019). Diyabet modeli oluşturulan başka bir çalışmada *LGG* tedavisinin, endoplazmik retikulum (ER) ve oksidatif stresi hafifleterek

insülin duyarlılaştırıcı etki oluşturduğunu ve böylece *LGG*'nin glukoz toleransını iyileştirdiği belirtilmiştir (Park ve ark., 2015).

2.3.3. Probiyotikler ve Erkek İnfertilitesi

Probiyotiklerin fertilitiyi arttırmadaki etkinliği iki seviyede ele alınmaktadır: bunlardan ilki diyabet, yağlı diyet, yaşlılık vb. gibi etkenlerin neden olduğu, testosteron seviyesini ve sperm kalitesini olumsuz yönde etkileyen oksidatif stresin olumsuz etkisini tersine çevirerek erkek fertilitésinin restorasyonu ve ikinci seviye kadın fertilitésinin iyileştirilmesidir. Çünkü intertilitenin altında yatan etkenler, kadın ve erkek kaynaklı birbirine bağı sebeplerden kaynaklanmaktadır (Hashem ve ark., 2022).

LGG'nin erkek üreme üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte, farelerde yapılan bir çalışmada kronik stres uygulamasının erkek üreme bozuklukları üzerindeki zararlı etkilerinin *LGG* probiyotik uygulaması ile önlenip önlenemeyeceğı araştırılmıştır (Guo ve ark., 2020). Bu çalışmada *LGG* probiyotik uygulamasının oksidatif stresi önleyerek sperm kalitesini iyileştirebileceğı belirtilmiş ve testiste testosteron biyosentezinde önemli olan STAR ve p450scc protein ekspresyonlarının stres grubunda azaldığı ancak *LGG* probiyotik uygulamasıyla arttığı bulunmuştur (Guo ve ark., 2020). Diyete bağı obezite fare modeli üzerinde yapılan başka bir çalışmada, *Lactobacillus Rhamnosus* PB01'in sperm kinematik parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (Dardmeh ve ark., 2017). Bu çalışma bulgularında probiyotik uygulamasının sperm motilitesini ve sperm kinematik parametrelerini önemli ölçüde iyileştirdiğı gösterilmiştir (Dardmeh ve ark., 2017). Zebra balıkları üzerinde yapılan bir çalışmada *L. Rhamnosus*'un doğumdan cinsel farklılaşmaya kadar olan etkilerine bakılmış ve bu türde normalde 8. haftada gerçekleşen testis farklılaşmasının probiyotik uygulamasının etkisiyle fertilizasyondan 3 hafta sonra başladığı tespit edilmiştir (Avella ve ark., 2012). Zebra balıkları üzerinde yapılan başka bir çalışmada *L. Rhamnosus* CECT8361 ve *Bifidobakterium Longum* CECT7347 olmak üzere iki bakteri karışımının sperm kalitesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu iki probiyotik karışımının büyüme, sperm kalitesi ve sağkalım üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (Valcarce ve ark., 2019). *L. Rhamnosus* IMC501 suşunun Avrupa yılan balıklarının üremesi üzerindeki etkisini araştıran farklı bir çalışmada ise testiste üreme sürecinde yer alan spesifik genler analiz

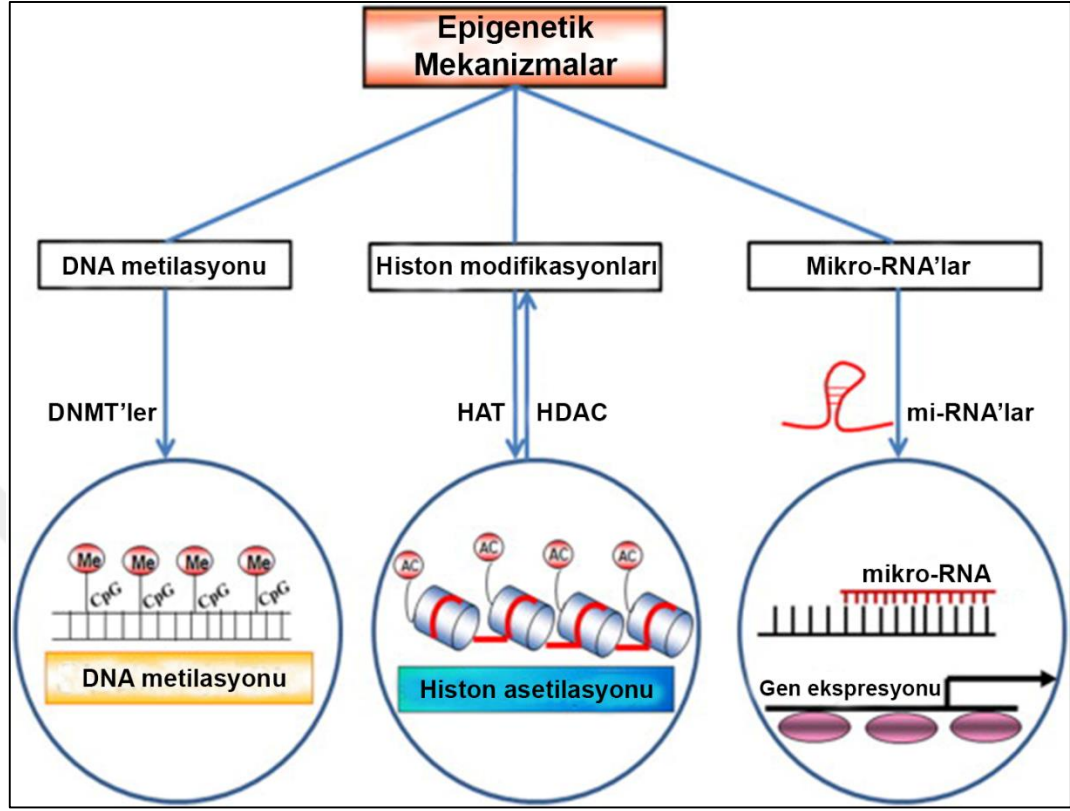
edilmiş, sperm üretimi ve motilitesi değerlendirilmiştir (Vilchez ve ark., 2015). Bu çalışmada probiyotik uygulamasının sperm üretimi ve sperm motilitesini arttırdığı ve spermatogenezi pozitif olarak modüle ettiği belirtilmiştir (Vilchez ve ark., 2015).

2.4. Epigenetik

2.4.1. Epigenetik Tanımı ve Mekanizmaları

"Epigenetik" terimi ilk olarak, daha yüksek organizmalarda gelişim ve farklılaşma ile ilgili olan genom ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimleri ifade etmek için kullanılmıştır. Günümüzde ise bu terim, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan kalıtsal değişiklikleri ifade etmek için kullanılmaktadır (Handy ve ark., 2011). Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından tanıtılmıştır (Deans ve ark., 2015). Epigenetik, DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonunu düzenleme potansiyeli olması nedeniyle umut verici bir araştırma alanıdır ancak insanlarda gerçekleştirildiğinde güvenlik ve etik kaygılara neden olabilmektedir (Deans ve ark., 2015).

Epigenetik mekanizmalar insan sağlığının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar, bir hücre içinde gen ekspresyonunu ve susturmayı düzenleyen bir kontrol katmanı oluşturarak işlev görür. Bu kontrol, dokuya özgü olup hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynar (Nora ve ark., 2022). Epigenetik modifikasyonlar tarafından yönlendirilen hücreler arasındaki gen ifadesindeki farklılıklar, belirli hücre tiplerinin benzersiz işleviyle sonuçlanır (Handy ve ark., 2011). Epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA) ile ilişkili gen susturma olmak üzere üç farklı şekilde incelenmektedir (Handy ve ark., 2011) (**Şekil 2.6**).

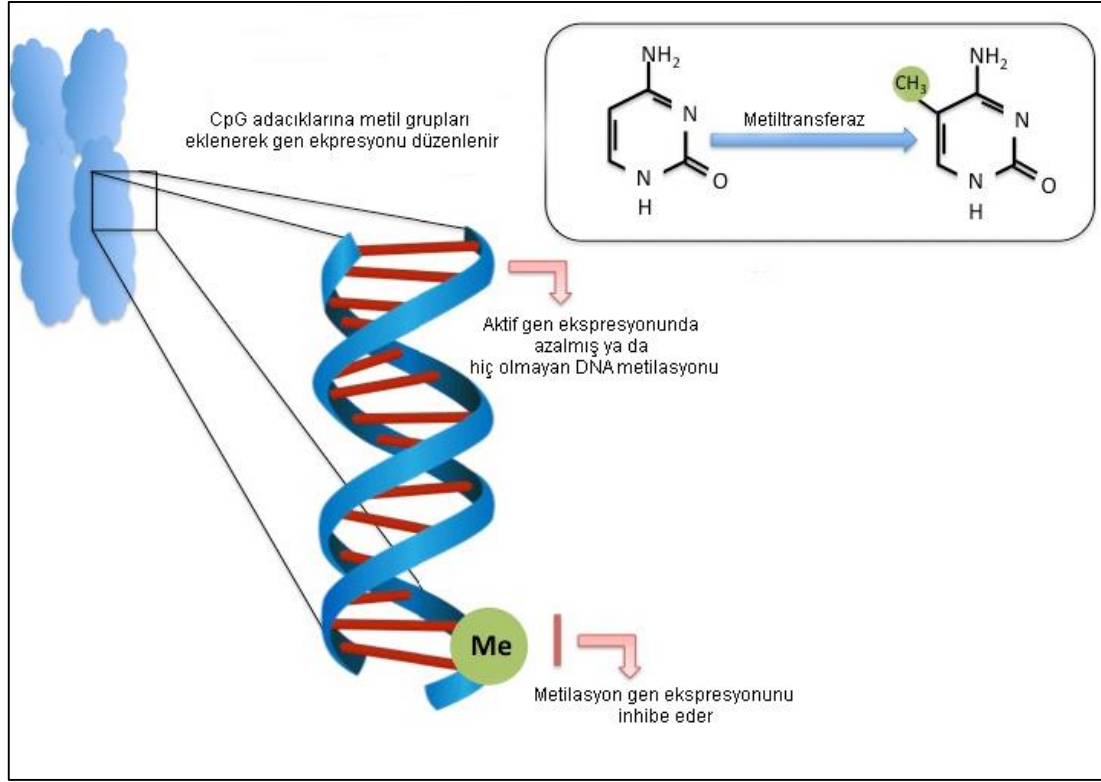


Şekil 2.6. Epigenetik mekanizmalar şematize edilmiştir. DNMT'ler gen metilasyonunda, HAT ve HDAC, histon asetilasyonunda ve kromatinin yeniden modellenmesinde, mikro-RNA'lar ise genlerin transkripsiyon sonrası kontrol sürecinde yer almaktadır. (DNMT: DNA metiltransferaz, HAT: Histon asetiltransferaz, HDAC: Histon deasetilaz, mi-RNA: Mikro-RNA) (Chaturvedi ve ark., 2014).

2.4.1.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, yüksek organizmalarda normal gelişim için oldukça önemli olan biyokimyasal bir süreçtir ve en kapsamlı şekilde incelenen epigenetik mekanizmadır (Coco ve ark., 2019) (**Şekil 2.7**). DNA metiltransferaz enzimleri (DNMT'ler) tarafından katalize edilen DNA metilasyonu, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısının düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting ve kromozom stabilitesinin sağlanması gibi birçok hücrel süreçte rol oynayan önemli bir düzenleyici mekanizmadır (Jin ve ark., 2011; Moore ve ark., 2013). DNMT'ler, genellikle bir sitozin-guanin adası (CpG) oluşturan diğer CpG'ler tarafından çevrelenen sitozinin 5. karbonuna metil grubu (CH₃) aktarırlar ve 5-metilsitozin (5mC) oluştururlar (Jin ve ark., 2011). 5mC düzeyi, sitozin metilasyonunun düzensizleştirilmesine neden olarak gelişim sürecinde, hücrel farklılaşmada veya hastalıklar da rol oynayabilir. Gen promotor bölgelerinin

yaklaşık %70'i CpG adaları içinde yer almaktadır. Promotör bölge içindeki metillenmiş sitozinler, gen baskılayıcı proteinleri toplamak ve DNA ile transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimi azaltmakla görevlidir (Jin ve ark., 2011). Ayrıca sitozin metilasyonu, heterokromatin oluşumunu da yönlendirerek nükleozomların sıkıştırılmasını ve transkripsiyonel makinenin DNA ile etkileşime girmesini de önlemektedir (Nora ve ark., 2022). Böylece, promotör bölgeleri içindeki DNA metilasyonu, gen susturulmasına neden olmaktadır (Nora ve ark., 2022) (**Şekil 2.7**). Memeli promotörlerinde metilasyon derecesini tanımlayan son araştırmalar, metilasyonun CpG dinükleotitlerinin yalnızca küçük bir yüzdesinde meydana geldiğini ve farklılaşmış hücrelerde yalnızca küçük bir gen alt kümesinin transkripsiyonunu engellediğini göstermektedir. CpG adaları, özellikle promotörlerle ilişkili olanlar, fareler ve insanlar arasında yüksek oranda korunmuştur. Pluripotensi genleri de dahil olmak üzere bu baskılanmış genlerin çoğu, germ hattına özgüdür (Moore ve ark., 2013). Bu durum, metilasyonun farklılaşma sırasında anahtar genleri baskılamak için çok önemli bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Moore ve ark., 2013). Bununla birlikte, somatik hücrelerde DNA metilasyonunun %98'den fazlası bir CpG dinükleotit bağlamında meydana gelirken, tüm metilasyonun dörtte biri kadarı embriyonik kök hücrelerde (EKH'ler) CpG olmayan bir bağlamda ortaya çıkmaktadır (Jin ve ark., 2011). DNA metilasyonu, erken embriyogenez sırasında kaldırılmakta ve devamında embriyo implantasyonu sırasında yeniden düzenlenmektedir (Messerschmidt ve ark., 2014).



Şekil 2.7. DNA metilasyonu. Sitozin nükleotitlerinin metilasyonu. DNA metilasyonu, DNMT'ler olarak isimlendirilen bir enzim ailesi tarafından katalize edilir. Metilasyon genel olarak gen inaktivasyonu ile ilişkili gen promotör bölgelerindeki CpG adaları çevresinde meydana gelir (Carroll ve ark., 2015).

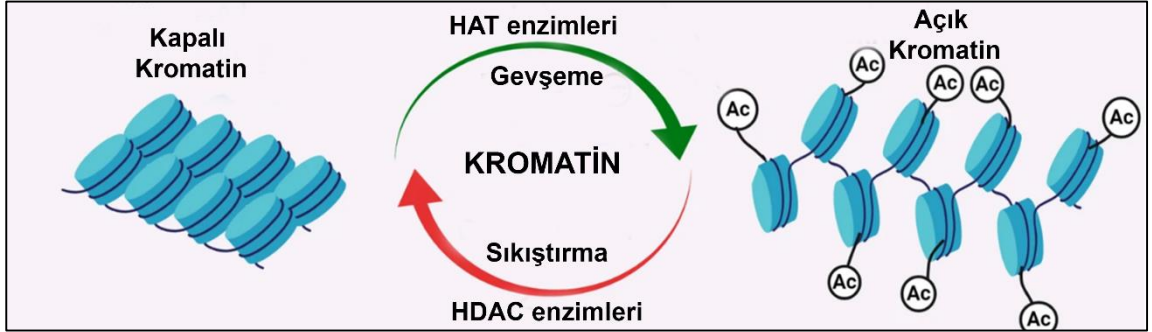
2.4.1.2. Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyonu, kromatin mimarisini değiştiren ve kromatin yapısını açarak veya kapatarak gen ifadesini düzenleyen kritik bir epigenetik modifikasyondur. Hücre döngüsünün ilerlemesinde ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar. İlk olarak 1964'te tanımlanan histon asetilasyonu, histon kuyruklarındaki lizin kalıntılarına bir asetil grubunun eklenmesini içerir. Genellikle transkripsiyonel aktivasyonla ilişkilidir ve iki karşıt enzim grubu tarafından modüle edilir; asetil gruplarının eklenmesinden sorumlu olan histon asetil transferazlar (HAT) ve bunları ortadan kaldıran histon deasetilazlar (HDAC) (**Şekil 2.8**).

HAT enzimleri, kofaktör olarak asetil CoA'yı kullanarak lizinin ϵ -amino grubuna bir asetil grubu ekler ve böylece lizin üzerindeki pozitif yükü nötralize ederek, histon-DNA etkileşimini zayıflatır ve genleri erişilebilir hale getirir (Bannister ve ark., 2011). Ayrıca HAT enzimlerinin, çok çeşitli proteinden oluştuğu da bilinmektedir. Şu ana kadar

insanlarda yaklaşık 30 HAT enzimi tespit edilmiş olup, bu enzimler öncelikle hücre içi lokalizasyonlarına göre Tip A ve Tip B olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Tip A enzimleri çekirdekte lokalize olurken, Tip B'ler ise sitoplazmada bulunur. A Tipi HAT enzimleri, kromatindeki transkripsiyonla ilişkili histon asetilasyonunda işlev görürken, B Tipi HAT'ler ise yeni sentezlenen histonları asetile eder ve nükleozomun yapısını etkiler (Roth ve ark., 2001) (**Şekil 2.8**).

Diğer bir enzim grubu olan HDAC'ler, hem histon hem de histon olmayan proteinlerin lizin kalıntılarından asetil gruplarını uzaklaştıran transkripsiyon sonrası modülatörlerdir (Seto ve ark., 2014). İnsanlarda 18 HDAC enzimi tanımlanmış ve mayaya olan sekans homolojilerine göre dört sınıfa ayrılmıştır. Bunlar, sınıf I (HDAC 1, 2, 3 ve 8), sınıf II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 ve 10), sınıf III (SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7) ve sınıf IV (HDAC 11) olarak gruplanmıştır (Seto ve ark., 2014; Hadley ve ark., 2019). Sınıf I, II ve IV HDAC'ler çinkoya bağımlı enzimlerken, sınıf III HDAC'ler ise nikotinamid adenin dinükleotide (NAD⁺) bağımlıdır. HDAC enzimleri proliferasyon, hücre döngüsü, rejenerasyon, apoptoz ve farklılaşma gibi temel hücre fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir (Hadley ve ark., 2019) (**Şekil 2.8**).

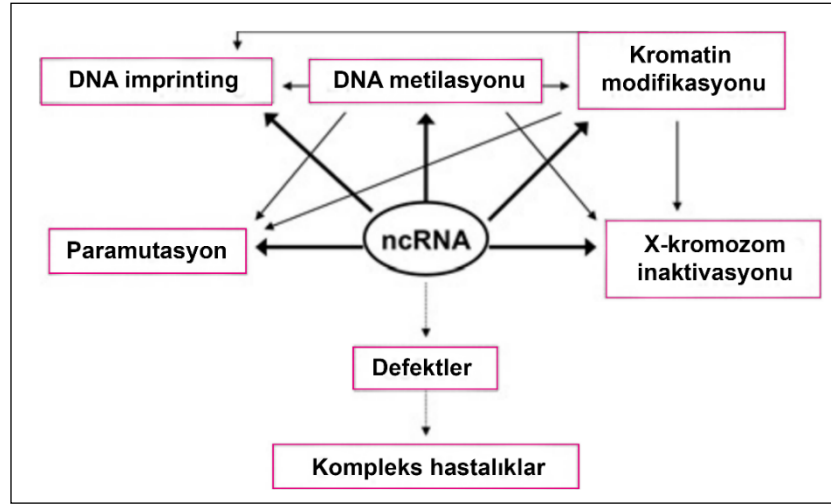


Şekil 2.8. Histon asetilasyonu. Histon asetilasyonu, kromatini gevşeterek ve transkripsiyonel aktivasyona izin vererek nükleustaki kromatin yapısının konformasyonunu değiştirir. Hem histon hem de histon olmayan proteinlere sırasıyla asetil grubu ekleyen veya çıkaran, dolayısıyla gen transkripsiyonunu düzenleyen iki grup HAT ve HDAC enzimi tarafından düzenlenir. (Ac: asetilasyon) (Gujral ve ark., 2020).

2.3.1.3. Kodlanmayan RNA'lar ile İlişkili Gen Susturma

En son açıklanan epigenetik mekanizma, kodlanmayan RNA'lar ile ilişkili gen susturulmasıdır (Frias-Lasserre ve ark., 2017). Kodlanmayan bir RNA (ncRNA),

kopyalanan ancak proteinlere çevrilmeyen fonksiyonel bir RNA molekülüdür. ncRNA molekülleri, 30'dan az nükleotid içeren mikroRNA'ları (miRNA), susturucu RNA'ları (siRNA) ve 200 nükleotid veya daha uzun olan uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA) içermektedir (Frias-Lasserre ve ark., 2017). Epigenetikteki rollerinin tamamı hala araştırılıyor olsa da, ncRNA'ların gen susturmanın yanı sıra DNA metilasyonuna ve histon modifikasyonlarına da katıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Wei ve ark., 2017). siRNA'ların ve lncRNA'ların her ikisinin de, özellikle heterokromatin oluşumu yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Chisholm ve ark., 2012; Frias-Lasserre ve ark., 2017) (**Şekil 2.9**).



Şekil 2.9. ncRNA'lar çeşitli epigenetik mekanizmalarla ilişkilidir. Bu mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, kromatin yeniden modellenmesi, X-kromozom inaktivasyonu, genomik imprinting ve paramutasyon yer almaktadır (Zhou ve ark., 2010).

2.4.1.4. DNA Metiltransferaz Enzim Ailesi (DNMT'ler)

DNA metiltransferaz enzimleri, epigenetik düzenlemede kilit bir role sahip, korunmuş bir sitozin metilaz ailesidir. Şu ana kadar memelilerde 6 adet DNMT enzimi tanımlanmıştır; DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C, DNMT3L ve DNMT2 (Uysal ve ark., 2017). Tüm DNMT'ler, enzim ve substrat arasında gerçekleşen, kovalent reaksiyon oluşumu ile karakterize edilen benzer bir katalitik mekanizma kullanmaktadır. Bu enzimler, büyük bir N-terminal düzenleyici alan (NH_3^+) ve bir C-terminal katalitik alan (COOH^-) ve merkezde bulunan bağlayıcı bölge olmak üzere üç ana parçadan oluşurlar (**Şekil 2.10**).

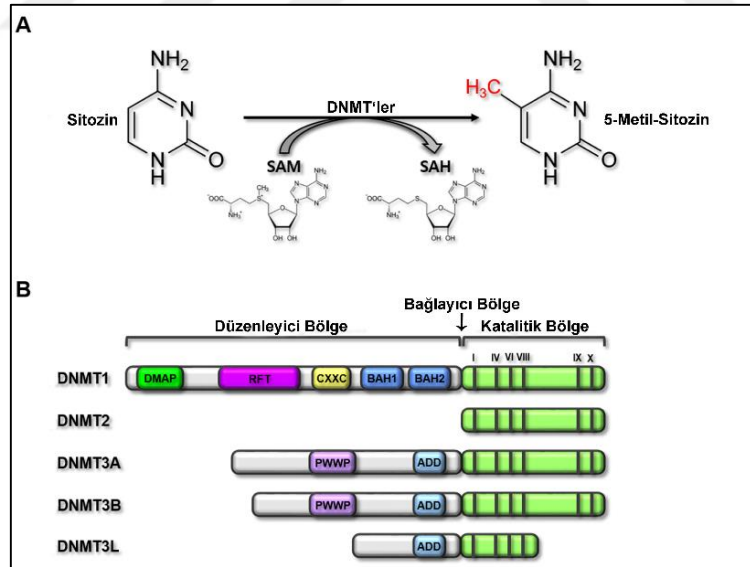
DNMT1, en çok çalışılan, biyokimyasal olarak karakterize edilen ilk memeli DNA metiltransferaz enzimi olup, normal hücrelerde mevcut metilasyon modellerinin korunmasına ve çoğaltılmasına katıldığı için genomik bütünlüğün başlıca koruyucusudur (Xu F. ve ark., 2010). Metillenmemiş DNA yerine hemimetillenmiş DNA üzerinde metiltransferaz aktivitesi gösterir ve S fazı sırasında DNA replikasyon odaklarında lokalize olarak her replikasyon turundan sonra metilasyonun devamlılığını sağlamakla sorumludur. DNMT1, insanlarda ~1.620 amino asit içeren büyük bir enzimdir (Xu F. ve ark., 2010). Genellikle normal veya dinlenme halindeki bir hücrede düşük düzeyde DNMT1 ifadesi mevcuttur (Xu F. ve ark., 2010). Enzimin bu bazal ekspresyon durumu, farklı hücresel sinyal yollarıyla değiştirilebilmektedir. Çalışmalar, DNMT1'in genomik DNA'nın *de novo* metilasyonu için de gerekli olabileceğini göstermektedir (Xu F. ve ark., 2010; Moore ve ark., 2013). DNMT1'in kaybı, embriyonik letaliteye, imprinting eksikliğine ve genomda yaygın demetilasyonuna neden olur (Moore ve ark., 2013).

DNMT3A ve DNMT3B, DNMT1'in aksine, metillenmemiş CpG dinükleotitlerini tercih ederek, erken gelişimde *de novo* metilasyonda fonksiyonel olarak işlev görürler (Xu F. ve ark., 2010). DNMT3A ve DNMT3B, yapı ve işlev açısından son derece benzerdir. DNMT3A'yı DNMT3B'den temel olarak ayıran özellik, gen ekspresyon modelidir (**Şekil 2.10**). DNMT3A nispeten her yerde eksprese edilse de, DNMT3B tiroid, testisler ve kemik iliği haricinde farklılaşmış dokuların çoğunluğu tarafından zayıf bir şekilde eksprese edilmektedir (Moore ve ark., 2013). Çalışmalar, DNMT3A nakavt farelerin hayatta kaldığını ancak sadece 4 haftaya kadar yaşayabildiğini göstermiştir. Bunun aksine DNMT3B'in nakavt edildiği farelerin ise çok sayıda gelişim anomalisi göstermeleri nedeniyle, embriyonik letalite ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (Liao ve ark., 2015). Dolayısıyla bu sonuçlar, DNMT3A'nın normal hücre farklılaşmasında, DNMT3B'nin ise erken gelişim sırasında gerekli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, DNMT3A ve DNMT3B'nin hücre replikasyonu sırasında metilasyonun sürdürülmesinden de sorumlu olduğu düşünülmektedir (Liao ve ark., 2015).

DNMT3L, esas olarak erken gelişimde ifade edilirken yetişkinlikte ekspresyonu germ hücreleri ve timus ile sınırlıdır (Moore ve ark., 2013). DNMT3L'nin kendi katalitik işlevi olmamasına rağmen, DNMT3A ve DNMT3B ile birleşir ve bu enzimlerin metiltransferaz aktivitelerini uyarır. Ayrıca DNMT3L, oogenezde maternal genetik imprintlerin

oluşturulması, retrotranspozonların metillenmesi ve X kromozomunun kondensasyonu için gereklidir (Bourc'his ve ark., 2001). DNMT3L gelişmekte olan beyinde eksprese edilse de, nöronal farklılaşma sırasında down regüle edildiği ve doğum sonrası beyinde gözlenmediği de bilinmektedir (Moore ve ark., 2013).

DNMT2, DNA yerine aspartik asit transfer RNA'sının antikodon döngüsünde sitozin-38'i metilleyen bir metiltransferaz homologudur. Dolayısıyla, zayıf DNA metiltransferaz aktivitesi göstererek aslında bir RNA metiltransferaz olarak işlev görür (Jeltsch ve ark., 2017). DNMT2'nin küçük RNA moleküllerini endonükleolitik bölünmeye karşı koruyarak memeli paramutasyon yolağında yer alabileceği öne sürülmüştür ve bu nedenle kalıtsal epigenetik fenotipleri indükleyebilir (Liebers ve ark., 2014). DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B ile aynı homolojiyi paylaşırsa da katalitik aktiviteye sahip değildir. Bunun yerine DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B'nin metil gruplarına bağlanma yeteneğini arttırdığı, böylece *in vivo* metilasyonu kolaylaştırdığı bilinmektedir (Veland ve ark., 2019) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Memeli DNMT'lerinin yapısal ve fonksiyonel alanları. **A)** DNMT aracılı metilasyonun kimyasal reaksiyonu. **B)** DNMT aile üyelerinin etki alanı yapıları. DNMT1, düzenleyici bölgedeki DMAP, RFTD, CXXC ve iki BAH'e sahip en uzun üyedir. DNMT2, yalnızca katalitik bölgesi olan en küçük üyedir. DNMT3A ve DNMT3B, düzenleyici bölgede ortak olarak PWWP ve ADD'ye sahiptir. DNMT3L, daha kısa katalitik bölge ile düzenleyici bölgede sadece ADD'ye sahiptir. Katalitik bölgedeki çubuklar (I, IV, VI, VIII, IX ve X), katalitik aktif bölgeleri temsil etmektedir. (SAM, S-adenosil-1-metiyonin; SAH, S-adenosil-1-homosistein; DNMT: DNA metiltransferaz, DMAP: DNA metiltransferaz ile ilişkili protein 1-etkileşimli alan, RFT: çoğaltma odakları hedefleme dizi alanı, CXXC: CXXC alanı, BAH: bromo-bitişik homoloji alanı, PWWP: PWWP alanı, ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L alanı) (Yi, 2021).

2.4.2. Epigenetik Programlama ve T1DM

Epigenetik modifikasyon, çok hücreli organizmalarda gen ifadesinde ve hücresel fonksiyonlarda plastisite sağlar. Büyüme, yaşlanma ve metabolizma da dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci etkileyebilir ve memelilerde normal gelişim ve doku spesifik ekspresyonun devamlılığı için gereklidir (Christensen ve ark., 2011).

T1DM'in, genetik ve epigenetik değişiklikler gibi birbiriyle bağlantılı birkaç faktörden kaynaklanan otoimmün bir bozukluk olduğu da bilinmektedir (Hakonarson ve ark., 2011). T1DM insidansındaki hızlı artış, T1DM etiyojisinde epigenetik değişikliklerin önemini ortaya koymaktadır (Olsen ve ark., 2016; Zullo ve ark., 2017). Epigenetik gen düzenlemesinde rol oynayan kilit mekanizmalar arasında, özellikle DNA metilasyonu ve DNA dizisinin işlevsel niteliklerini değiştiren histon modifikasyonları bulunur. Bu faktörler oksidatif stres, inflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ve hiperglisemi gibi patolojik faktörlerle doğrudan ilişkilidir (Singh ve ark., 2020). Bunlar gen ekspresyonunun değişmesine neden olur ve bir DNA dizisinde spesifik değişiklikler olmaksızın diyabetes mellitus patolojisindeki hücreleri hedefler (Singh ve ark., 2020). Değiştirilmiş gende meydana gelen epigenetik modifikasyon, esas olarak DNA hipermetilasyonu, histon deasetilasyonu ve miRNA düzensizliğini ile sonuçlanır (Forlenza ve ark., 2011). Bu epigenetik faktörlerin insülin salgılanması ve T1DM hastalık patogenezi riski üzerinde doğrudan etkileri vardır (Singh ve ark., 2020).

Literatürde, T1DM için oluşturulan farklı hayvan modelleri üzerinde DNA metiltransferazlara bakılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. T1DM modeli oluşturulan farelerde, farmakolojik özelliği olan Baicalin'in böbrek hasarındaki koruyucu etkisine bakılan bir çalışmada, diyabet indüksiyonunun böbrekte DNMT1 ekspresyonunu değiştirmedeği ancak DNMT3A ve DNMT3B ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Zhang X. T. ve ark., 2020). Sprague Dawley sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen farklı bir çalışmada, T1DM'in kardiyak fibrozdaki DNMT1 metilasyon ilişkili mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışmada DNMT3A ve DNMT3B protein ekspresyonları da değerlendirilmiştir (Tao ve ark., 2020). Çalışma sonuçlarında, DNMT1 ekspresyonunun arttığı, DNMT3A ve DNMT3B ekspresyonlarının ise değişmediği vurgulanmıştır (Tao ve ark., 2020). Diyabetik retinopati gelişiminde DNMT1 rolünü Moğol Gerbilleri üzerinde

araştıran bir çalışmada, DNMT1 ve DNMT3B ekspresyon seviyelerinin önemli düzeyde arttığı belirtilmiştir (Wang X. ve ark., 2022c). T1DM modeli oluşturulan ve folik asitin koruyucu etkisini araştıran başka bir çalışmada, diyabetik farelerde DNMT1 mRNA ekspresyonunun arttığı söylenmiştir (Zheng ve ark., 2017). T1DM patogenezi altında yatan DNMT'ler aracılı epigenetik değişikliklerin testiste nasıl düzenlendiği hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir.

2.4.3. DNA Metiltransferazlar ve Probiyotik İlişkisi

Hücrel çevredeki mikrobiyota ve probiyotikler, farklı epigenetik mekanizmalar aracılı konak tepkilerini ortaya çıkarabilen kritik uyaranlara hizmet edebilir. DNMT'ler ve probiyotikler üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatür bilgisi değerlendirildiğinde, koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada, koyun genotipi ile 5-metilsitozin DNA metilasyon modelleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır (Pepoyan ve ark., 2020). Çalışma bulgularında, probiyotik *Lactobacillus acidophilus* uygulamasından sonra 5-metilsitozin yüzdesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Pepoyan ve ark., 2020). Sıçanlar üzerinde yanık modeli oluşturulan bir çalışmada, DNMT1'in hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonunun azaldığı, tedavi edici probiyotiklerin kombinasyon halinde uygulamasının ise azalan DNMT1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Gong ve ark., 2017). Domuz yavruları üzerinde yapılan farklı bir çalışmada ise, selenyumla zenginleştirilmiş probiyotiklerin böbrek hasarı ve DNMT ekspresyonları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, hasar oluşturmak için kullanılan Okratoksin A'nın DNMT1 ve DNMT3A mRNA ve protein ekspresyonlarını arttırdığı, probiyotiklerin ise artan bu proteinlere ait ekspresyonları tersine çevirdiği tespit edilmiştir (Gan ve ark., 2021).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

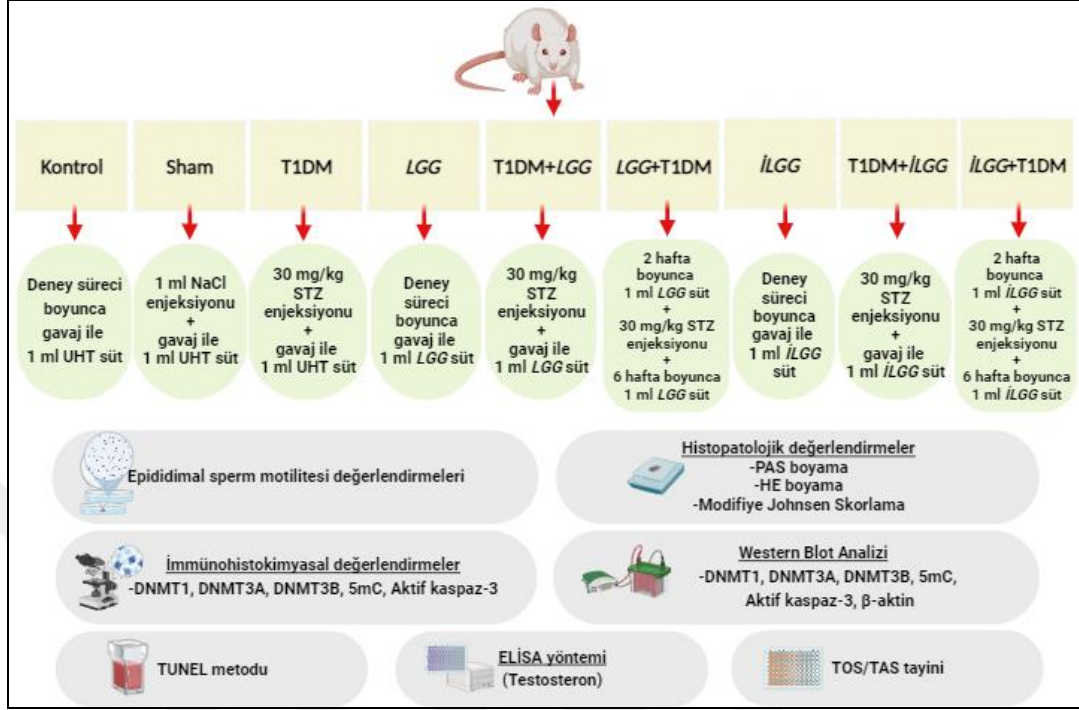
Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma merkezi tarafından sağlanan 6-8 haftalık erişkin erkek Wistar ratlar (toplam n=63) kullanıldı. Ortama alışmaları için çalışmaya başlamadan önce denekler bir hafta boyunca standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz-12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20–22 derece oda ısısı, %50–60 nem) tutuldu. Hayvanlar standart yem ve su ile beslendi. Amacımıza uygun olarak deney modelimize ait gruplarımız (**Şekil 3.1**) aşağıda sunulmuştur;

- **Kontrol Grubu:** Erişkin erkek sıçanlar standart laboratuvar koşullarında tutuldu ve deney süresince gavaj yoluyla 1 ml UHT (Ultra High Temperature) yöntemi ile işlenen laktozsuz süt verildi (n=7).
- **Sham Grubu:** Erişkin erkek sıçanlara 5 gün boyunca STZ enjeksiyonu yerine 1 ml serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) enjeksiyonu yapıldı ve devamında deney süresi bitimine kadar gavaj yoluyla UHT laktozsuz süt verildi (n=7).
- **Tip 1 Diyabet (T1DM) Grubu:** Erişkin erkek sıçanlara ardışık 5 gün boyunca 30 mg/kg STZ enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı ve devamında deney süresi bitimine kadar gavaj yoluyla 1 ml UHT laktozsuz süt verildi (n=7).
- ***Lactobacillus Rhamnosus* GG (LGG) Grubu:** Erişkin erkek sıçanlara 8 hafta boyunca probiyotik LGG kullanılarak üretilen fermente süt takviyesi 1 ml olarak gavaj yoluyla uygulandı (n=7).
- **T1DM + LGG Grubu:** Probiyotik LGG'nin T1DM'deki olası tedavi edici etkisini gözlemlemek amacıyla, erişkin erkek sıçanlara ardışık 5 gün boyunca 30 mg/kg STZ enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapıldı ve ardından gavaj yoluyla 8 hafta boyunca probiyotik LGG kullanılarak üretilen fermente süt 1 ml olarak verildi (n=7).
- **LGG + T1DM Grubu:** Probiyotik LGG'nin T1DM'deki olası koruyucu etkisini gözlemlemek amacıyla, erişkin erkek sıçanlara 2 hafta boyunca gavaj ile probiyotik LGG kullanılarak üretilen fermente süt 1 ml olacak şekilde uygulandı

ve ardından ardışık 5 gün boyunca 30 mg/kg STZ enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapıldı ve sonrasında 6 hafta boyunca *LGG* kullanılarak üretilen fermente süt gavaj yoluyla 1 ml olarak tekrar verildi (n=7).

- ***İnaktif Lactobacillus Rhamnosus GG (İLGG) Grubu:*** Erişkin erkek sıçanlara 8 hafta boyunca probiyotik *İLGG* kullanılarak üretilen fermente süt takviyesi 1 ml olarak gavaj yoluyla uygulandı (n=7).
- ***T1DM + İLGG Grubu:*** Parabiyotik *İLGG*'nin T1DM'deki olası tedavi edici etkisini gözlemlemek amacıyla, erişkin erkek sıçanlara ardışık 5 gün boyunca 30 mg/kg STZ enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapıldı ve ardından gavaj yoluyla 8 hafta boyunca probiyotik *İLGG* kullanılarak üretilen fermente süt 1 ml olarak uygulandı (n=7).
- ***İLGG + T1DM Grubu:*** Parabiyotik *İLGG*'nin T1DM'deki olası koruyucu etkisini gözlemlemek amacıyla, erişkin erkek sıçanlara 2 hafta boyunca gavaj ile probiyotik *İLGG* kullanılarak üretilen fermente süt 1 ml olarak uygulandı ve ardından ardışık 5 gün boyunca 30 mg/kg STZ enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapıldı ve sonrasında 6 hafta boyunca *İLGG* kullanılarak üretilen fermente süt 1 ml olarak gavaj yoluyla tekrar verildi (n=7).

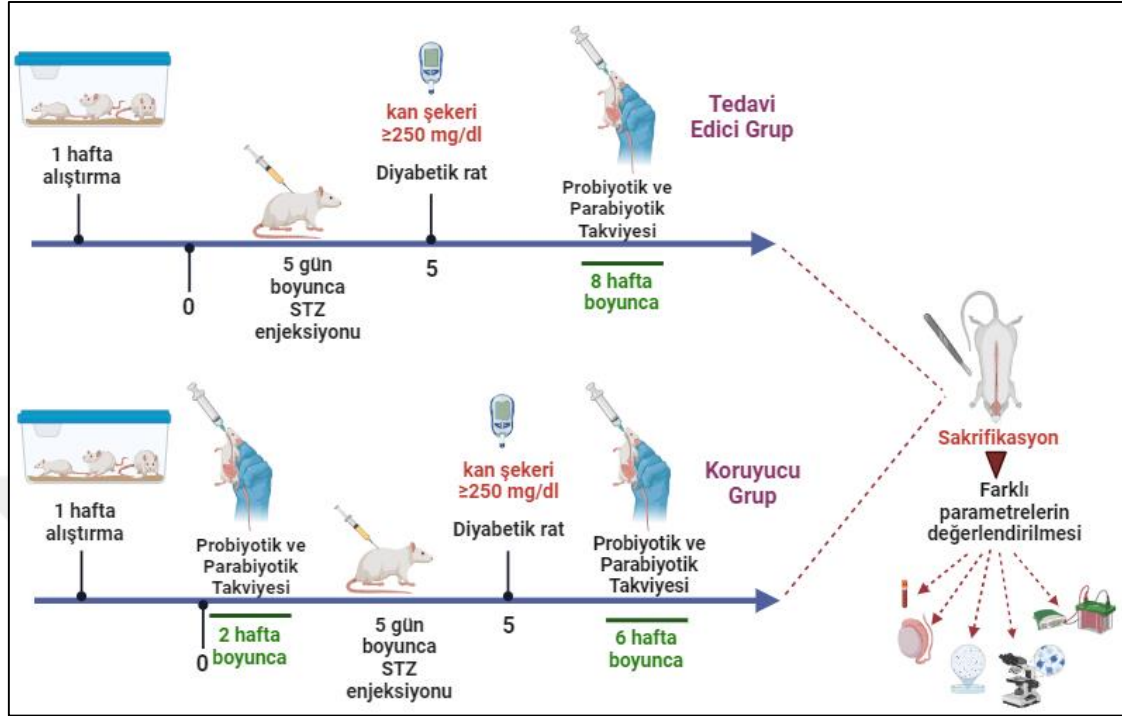
Canlı mikroorganizmalara potansiyel bir alternatif, yararlı işlevleri korunduğu sürece onları etkisiz hale getirmektir. Isıl işlemin hücresel bütünlük ve protein yapısı üzerindeki potansiyel etkisi nedeniyle, probiyotikleri etkisiz hale getirmek dolayısıyla inaktive etmek, faydalı fonksiyonlarını sürdürmek adına önemlidir (Lopez ve ark., 2008). Bu nedenle çalışmamızda, ısıl işlem ile inaktive edilmiş *Lactobacillus rhamnosus GG* (*İLGG*-parabiyotik) ile canlı *LGG*'nin T1DM üzerinde tedavi edici ve T1DM'den koruyucu rollerinin karşılaştırılması da amaçlanmıştır. Bu kapsamda, *LGG*'nin hangi formunun T1DM üzerinde daha etkili olduğu da ortaya konulmuştur.



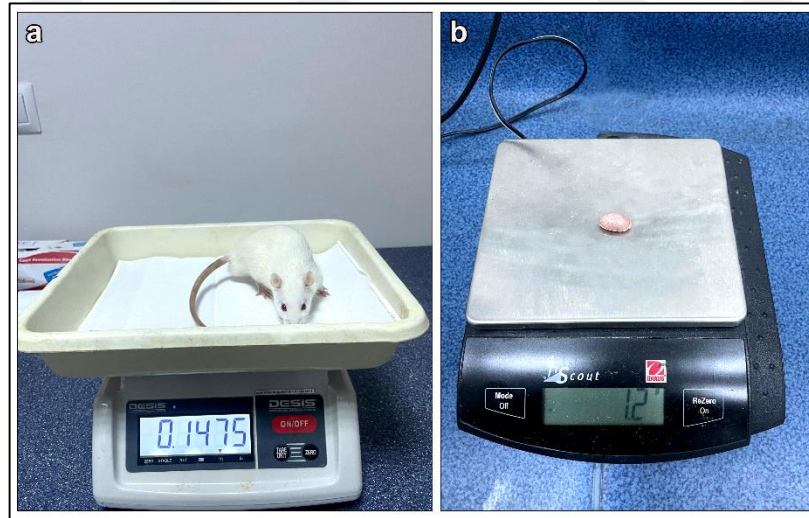
Şekil 3.1. Projede oluşturulan deney grupları ve uygulanan yöntemler şematize edilmiştir.

3.2. STZ'ye Bağlı Diyabet Modelinin Oluşturulması

T1DM modeli oluştururken dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan biri kan glukoz seviyesidir. 8 haftalık Wistar sıçanlarda diyabeti indüklemek için STZ kullanıldı. STZ, kullanımdan hemen önce 0.01 M sitrat tamponu (pH 4.5) içinde çözüldü ve diyabet oluşturmak için sıçanlara intraperitoneal olarak enjekte edildi (Şekil 3.4). Hiperglisemiye indüklemek için arka arkaya 5 gün boyunca 30 mg/kg STZ (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ABD) enjeksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Diyabetik sıçanların kan glukozu ve vücut ağırlıkları aralıklı olarak kaydedildi (Erendor ve ark., 2021). Sıçanların vücut ağırlıkları haftada bir defa olmak üzere deney bitimine kadar DESIS T28 elektronik terazi ile gerçekleştirilirken, deney bitiminde alınan testislerin ağırlık ölçümleri için Scout ohous marka hassas tartı kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Deney modelinin oluşturulması şematize edilmiştir.

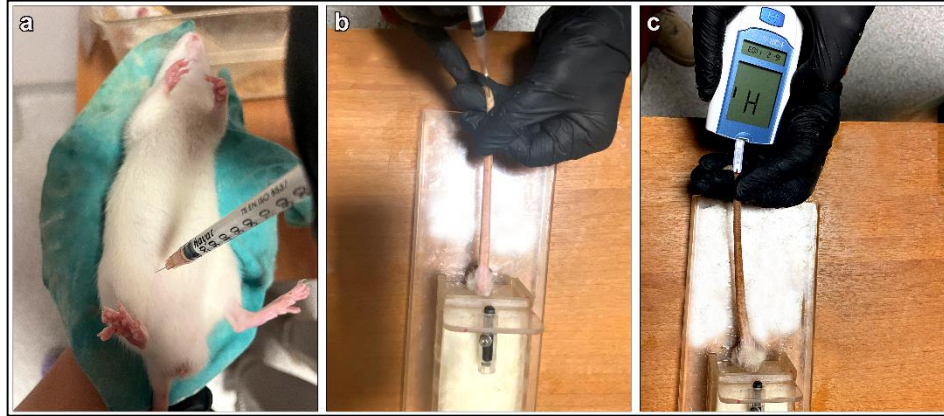


Şekil 3.3. (a) Haftalık sıçan tartımları ve (b) testis ağırlık tartımları sunulmuştur.

3.3. Kan Glukoz Ölçümleri ve Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)

Glukoz seviyeleri, Fora G20 şeker ölçüm cihazı aracılığıyla kuyruk damarından alınan kan kullanılarak ölçüldü. Ardışık iki ölçümde >250 mg/dL kan şekeri değerleri diyabetik olarak kabul edildi (Erendor, Eksi et al. 2021) (**Şekil 3.4**). Hayvanların beslenme davranışlarındaki farklılıklardan kaynaklanan değişiklikleri önlemek için öğleden sonra erken saatlerde kan şekeri ölçümleri alındı.

Diyabet gelişimi sırasında değişen parametrelerden biri de glukoz toleransıdır. Kandaki glukoz miktarına bağlı olarak, insülinin düzenli salınımı için kan glukozunun temizlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte glukoz toleransı bozulmaya başladığında yüksek düzeylerde bulunan glukoz, beklenen süre içinde kandan yeteri kadar temizlenemez. Bu değerlerin nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla, hayvanlar 12 saat boyunca aç bırakıldı ve açlık kan şekeri düzeyleri ölçüldü. Süre sonunda sıçanlara oral glukoz tolerans testi yapıldı. Bu test için sıçanlara %40 glukoz içeren solüsyon (2,5g/kg) verildi. Kan şekeri ölçümleri 0, 15, 30, 60, 120 ve 240. dakikalarda tekrar edildi (Kaikini ve ark., 2020).



Şekil 3.4. (a) STZ enjeksiyonu, (b) enjeksiyon sonrası kuyruk damarından kan alımı ve (c) kan glukoz ölçümü gösterilmektedir.

3.4. Probiyotik Süt Ürünü Üretimi

Probiyotik süt ürününün üretilmesinde piyasadan temin edilen UHT laktozsuz süt kullanıldı. Sıcaklığı 37°C 'ye getirilen UHT laktozsuz süte %1 oranında (son üründe en az 10^8 kob/ml olacak şekilde) *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®, Chr. Hansen, İstanbul,

Türkiye) aşılansarak sütler 37°C’de pH değersleri 4.6’ya ulaşınca kadar inkübe edildi (Sun ve ark., 2019). İnkübasyondan sonra fermente sütler ikiye ayrıldı. Bir kısım 4°C’de soğutuldu ve analizlerde kullanılmak üzere depolandı. Diğer kısım fermente süt 95°C’de 30 saniye süresince ısıl işleme tabi tutularak *Lactobacillus rhamnosus* GG bakterisinin tamamının inaktivasyonu (*İLGG*) gerçekleştirildi. Isıl işlemde sonra 4°C’de soğutularak inaktif bakteri içeren süt ürünü analizlerde kullanılmak üzere depolandı (Sawada ve ark., 2016). Elde edilen probiyotik *LGG* ve parabiyotik *İLGG* fermente sütleri sıçanlara oral gavaj ile takviye edildi (**Şekil 3.5**).



Şekil 3.5. Oral gavaj uygulaması gösterilmektedir.

3.5. Dokuların Toplanması ve Rutin Parafin Takibi

Deney süreci sonunda denekler üretan anestezisi altında %0,9 luk heparinize serum fizyolojik ile vasküler yıkama yapıldıktan sonra testisleri alındı. Bouin solüsyonunda [162,5 ml Pikrik asit (Sigma, katalog no: 197378), 12,5 ml Asetik asit (Sigma, katalog no:27225) ve 62,5 ml Formalin (Merck, katalog no: 1.04002)] 1 gün boyunca +4°C’de fikse edildi ve laboratuvarlarımızdaki rutin doku takibi protokolü uygulandı. Çeşme suyunda yapılan yıkamayı takiben (1 gün) dehidrasyon için artan etanol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100’lük) geçirildi. %70’lik etanolde 2 gün, %80 ve %90’lık etanolde birer gün bekletilen testisler, %100’lük etanolde ise 3 saat tutuldu. Dehidrasyon işleminden sonra, ksilol uygulaması ile dokunun şeffaflaştırılması gerçekleştirildi. Şeffaflaştırma işlemi, üç seri ksilol solüsyonunda gerçekleştirildi. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi yapıldı. Parafin I, parafin II ve parafin III aşamalarında, birer saat

60°C'lik etüvde tutuldu. Bu süre sonunda testis örnekleri temiz parafin içinde uygun oryantasyonda gömüldü. Bloklardan rotari mikrotom (Leica RM2125 RTS) kullanılarak 5µm kalınlığında seri kesitler pozitif şarjlı lamaların üzerine alındı.

3.6. Testis Ağırlık İndeksinin Hesaplanması

Deney bitiminde sıçanların vücut ağırlıkları ile sağ ve sol testislerin her biri ayrı olarak tartıldı. Toplam testis ağırlık indeksi (TAİ) aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\text{TAİ: } [(\text{sağ} + \text{sol testis ağırlıkları toplamı}) / \text{vücut ağırlığı}] \times 100$$

3.7. Epididimal Sperm Örneklerinin Toplanması ve Sperm Motilite Değerlendirmeleri

Deney süreci tamamlandığında kontrol ve deney grubu hayvanlarda skrotal kese üzerinde tek bir orta hat kesisi yapılarak deri kas tabakasından ayrıldı, daha sonra kas üzerinden benzer bir enine kesik yapılarak testis dışarı çıkarıldı, kauda epididimisin yağ tabakasıyla birlikte testisten ayrılması sağlandı. Çıkarılan epididimisin vaz deferense açılan kauda kısmı 37°C'de 1.5 mL önceden ısıtılmış fosfat tamponlu salin (PBS, pH = 7.4) içinde parçalandı. Spermatozoanın dağılabilmesi için doku petrife hafifçe çalkalandı (5-10 dakika). Numuneler, 37°C'de 20-25 dakika inkübe edildi ve sonrasında 10 mikrolitrelik örnek mikroskop altında Makler sayım kamerasında incelendi. Sayımlar aynı hayvandan en az 2 örnek üzerinden yapıldı (en az 200 sperm sayılarak) ve hareketli sperm motilitesi yüzde (%) olarak belirlendi (Celik-Ozenci ve ark., 2011).

3.8. Histopatolojik Değerlendirmeler

T1DM uygulamasının testis üzerindeki olası etkileri histopatolojik olarak değerlendirildi. Testiküler yapıyı daha iyi analiz edebilmek için deparafinizasyon işlemleri sonrasında kesitlerde periyodik asit schiff (PAS) ve hematoksilen-eozin (H&E) boyamaları yapıldı.

3.8.1. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

PAS boyası, glikojeni parçalayan diastaz enzimi ile birlikte kullanılmaktadır. Bu boya, glikojen varlığında magenta renk verir. Periyodik asit ve Schiff'in birlikte kullanılmasıyla, koyu magenta renginin yerini açık pembe renk almasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60°C'lik etüvde gece boyu bekletilerek, ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra musluk suyundan geçirildi ve %1'lik periyodik asit (H_5IO_6) solüsyonunda [0,8 gr Periyodik asit (Merck, katalog no: 8.22288.0100), 0,4 gr Sodyum asetat (Merck, katolog no: 6131-90-4) ve 90 ml distile su] 5 dakika oksidize edildikten sonra %70'lik alkolde çalkalandı. 15-45 dakika Schiff solüsyonunda (Merck, katalog no: M109033.0500) muamele edilen kesitler ardından akarsu altında yıkandı. Devamında, alkol serilerinden ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı. Periyodik asit Schiff ile boyalı preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu, tüm gruplarda seminifer tübüller değerlendirilerek, Leydig hücreleri, seminifer tübül bazal membranı ve akrozom yapısı net bir şekilde izlendi.

3.8.2. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Protokolü

Parafin bloklardan alınan kesitler 60°C'lik etüvde gece boyu bekletildikten sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra suya alınan kesitler, 30 saniye hematoksilene daldırılarak, akarsu altında yıkandı. Yıkamadan sonra eozine 2-3 kere daldırılıp çıkarıldı ve tekrar akarsu altında yıkandı. Alkol serilerinden ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı. Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis kesitlerinde, H&E boyaması ile seminifer tübüller ve interstisyel hücreler değerlendirildi.

3.8.3. Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlaması

H&E ile boyanan ışık mikroskobik testis kesitlerinde seminifer tübüllerin yapısını ve spermatogenezi değerlendirmek için Johnsen skorlaması yapıldı. Bu amaçla, testis örneklerine ait kesitlerde 20x objektifteki randomize farklı alanlar incelenerek, her grup için toplam 200 seminifer tübül değerlendirildi ve Johnsen kriterlerine göre 1'den 10'a kadar skorlandı. 10: tam spermatogenez ve mükemmel tübüller; 9: çok sayıda spermatozoa mevcut ve organizasyonu bozulmuş spermatogenez; 8: sadece birkaç spermatozoa mevcut;

7:spermatozoa yok ancak birçok spermatid mevcut; 6:sadece birkaç spermatid mevcut; 5:spermatozoa veya spermatid yok, ancak birçok spermatosit mevcut; 4:sadece birkaç spermatosit mevcut; 3:sadece spermatogonya var; 2:germ hücresi yok, sadece Sertoli hücreleri mevcut; 1:germ hücresi ve Sertoli hücresi yok (Mizuno ve ark., 2007) (**Tablo 3.1**).

Tablo 3.1. Testis kesitlerinde Johnsen Skorlaması ile tübüllerin değerlendirilmesi (Mizuno ve ark., 2007).

	Morfoloji
Skor 1	Germ hücresi ve Sertoli hücresi yok
Skor 2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücreleri mevcut
Skor 3	Sadece spermatogonya mevcut
Skor 4	Sadece birkaç spermatosit mevcut
Skor 5	Spermatozoa veya spermatid yok, ancak birçok spermatosit mevcut
Skor 6	Sadece birkaç spermatid mevcut
Skor 7	Spermatozoa yok ancak birçok spermatid mevcut
Skor 8	Sadece birkaç spermatozoa mevcut
Skor 9	Çok sayıda spermatozoa mevcut ve organizasyonu bozulmuş spermatogenez
Skor 10	Tam spermatogenez ve mükemmel tübüller

3.9. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

Deney gruplarından alınan testis örneklerinin parafin kesitlerinde DNMT1 (Cell Signaling, katalog no: 5032S), DNMT3A (Cell Signaling, katalog no: 3598S), DNMT3B (Thermo, katalog no: PA5-85549), 5-metilsitozin (Millipore, katalog no: MABE 146) ve aktif kaspaz-3 (Cell Signaling, katalog no: 9661) proteinleri için immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi.

3.9.1. İmmünohistokimya Protokolü

1. İmmünohistokimyasal incelemeler için 5 µm. kalınlığındaki kesitler ksilol yardımıyla parafinden kurtarıldı ve daha sonra derecesi azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) geçirilerek suya alındı.
2. Antijen retrieval uygulaması için, tüm antikorlar Tris EDTA (TE) [1,21 gr Tris (Merck, katalog no: 1.08387), 0,37 gr EDTA (Sigma, katalog no: E5134) ve 1 lt distile su karışımına 500 µl Tween 20 (Sigma, katalog no:S8026684) eklenerek hazırlandı] solüsyonu ile 15 dakika mikrodalga içinde (704W) kaynatıldıktan sonra 20 dakika soğuma aşaması için beklendi.
3. Bu işlemten sonra kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Merck, katalog no: Z377821) ile çizildi ve kesitler Tris tamponlu tuz solüsyonu + % 0.1 Tween-20 (Merck, katalog no: 8221840500) (TBS-T) solüsyonunda 3 kez beşer dakika yıkandı.
4. Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için kesitler %3'lük hidrojen peroksit [63 ml methanol (Merck, katalog no: 106009) + 7 ml hidrojen peroksit (Sigma, katalog no: 18304)] ile 20 dakika inkübe edildi.
5. Daha sonra TBS-T'de 3 kez beşer dakika yıkanan kesitler non-immün serum (Lab Vision, katalog no: TA-060-UB) ile bloklanıp yıkama yapılmadan, uygun dilüsyonda antikor dilüenti içerisinde (Thermo Scientific, katalog no: TA-125-UD) primer antikorlarla (DNMT1; 1:100, DNMT3A; 1:300, DNMT3B; 1:400, 5-metilsitozin; 1:300, aktif kaspaz-3; 1:300) gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
6. Tekrar TBS-T ile 3 kez 5 dakika yıkanıp, uygun biyotinli sekonder antikorlar (Vector Lab, katalog no: BA-1000, BA-2000) ile inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz kompleksi (Thermo Scientific, katalog no: TS-125-HR) ile 20 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyonu takip eden TBS-T ile yıkama aşamasından sonra DAB (Diaminobenzidin) (Sigma, katalog no: D4168-50) substratı verilerek enzim substrat ilişkisi sonucunda oluşan ürün kahverengi renk olarak gözlemlendi ve Mayer hematoksileninde (Merck, katalog no: M105174.0500) zıt boyama yapıp akabinde kesitler entellan (Merck, katalog no: 1.07961.0500) ile kapatıldı.

9. Işıık mikroskopu (Zeiss Axioplan) düzeyinde tüm deney gruplarındaki hedef proteinlerin testisteki ekspresyon ve lokalizasyonları değeriendirildi. Reaksiyonlar ImageJ analiz yöntemi (NIH, versiyon; 2.0.0-rc-69/1.52 p) ile değeriendirildi.

3.10. Western Blot Metodu

Deney gruplarına ait testis örneklerinde DNMT1 (Cell Signaling, katalog no: 5032S) DNMT3A (Cell Signaling, katalog no: 3598S), DNMT3B (Thermo, katalog no: PA5-85549), 5-metilsitozin (Millipore, katalog no: MABE 146), aktif kaspaz-3 (Cell Signalling, katalog no: 9661) ve β -aktin (Abcam, katalog no: ab6276) protein ekspresyon düzeylerinin semikantitatif olarak değeriendirilmesi için Western Blot analizi yapıldı.

3.10.1. Western Blot Protokolü

1. Total testiste, 0.2 gr dokuya 600 μ l ripa buffer (Thermo Scientific, katalog no: 89900) ve 10 μ l proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, katalog no: P8340) olacak şekilde inkübe edilerek sonikatör yardımı ile homojenize edildi.
2. Tüm örnekler, 15000 g'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları -20°C'de saklanmak üzere, protein lizatları hazırlandı ve dokuların içediğı protein miktarları BCA kiti (Vector Lab, katalog no: PK-6100) kullanılarak tespit edildi.
3. Elektroforezden önce, 100°C'deki suda örnekler 5 dakika kaynatılarak, %10 TGX FastCast Acrylamide Kit (BIORAD, katalog no: 161073) hazırlanmasının ardından, her kuyucuğa 10 μ l örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklendi ve Mini Protean Sistem III tankının içine yerleştirildi.
4. Mini Protean Sistem III tankına elektroforez solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika elektroforez edildi.
5. Elektroforez sonrasında proteinler Mini protean III sistemi kullanılarak PVDF membrana (BIORAD, katalog no: 162-0177) transfer edildi, Tris tamponlu tuz solüsyonu + % 0.1 Tween-20 (Merck, katalog no: 8221840500) (TBS-T) ile

hazırlanan % 5'lik yağsız kuru süt tozu (BioRad, katalog no: 170-6404) ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemi gerçekleştirildi.

6. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde sulandırılmış olan primer antikor (DNMT1; 1:1000, DNMT3A; 1:750, DNMT3B; 1:1000, 5-metilsitozin; 1:500, β -aktin; 1:3000) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı.
8. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile sulandırılmış uygun horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla (Vectorlab, katalog no: PI-1000 ve PI-2000, 1:2000) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı.
10. Membran Super Signal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi (Thermo, katalog no: 170-6404) ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında Azure C280 cihazında görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.
11. Böylece, testis örneklerinde DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve aktif kaspaz-3 protein ekspresyonları belirlendi ve β -aktin ile normalize edilerek ImageJ analizi ile semikantitatif olarak protein seviyeleri karşılaştırıldı.

Tablo 3.2. İmmünohistokimya ve Western Blot tekniğinde kullanılan primer ve sekonder antikor dilüsyonları sunulmuştur.

		Firma/ Katalog no	İmmünohistokimya Dilüsyon	Antijen retrieval metodu	Western Blot Dilüsyon
Primer antikorlar	DNMT1	Cell Signalling #5032S	1:100	Tris EDTA	1:1000 (TBS-T solüsyonu içinde)
	DNMT3A	Cell Signalling #3598S	1:300	Tris EDTA	1:750 (TBS-T solüsyonu içinde)
	DNMT3B	Thermo #PA5-85549	1:400	Tris EDTA	1:1000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	5-metilsitozin	Millipore #MABE 146	1:300	Tris EDTA	1:500 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	Aktif kaspaz-3	Cell Signalling #9661L	1:300	Tris EDTA	1:1000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	Beta-aktin	Abcam #ab6276			1:3000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
Sekonder antikorlar	Biyotinli anti- rabbit	Vector Laboratories #BA-1000	1:500		
	Biyotinli anti- mouse	Vector Laboratories #BA-2000	1:500		
	HRP-konjuge anti rabbit	Vector Laboratories #PI-1000			1:2000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	HRP-konjuge anti mouse	Vector Laboratories #PI-2000			1:2000 (%5 yağsız süt tozu içinde)

3.11. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz-aracılı dUTP Nick End Labeling (TUNEL) metodu

Literatürde T1DM'in testiste germ hücre apoptozunu arttırdığı ve anormal spermatogeneze neden olduğu bilinmektedir (JZ ve ark., 2021). Dolayısıyla, T1DM uygulamasının testiste DNA kırıklarının oluşmasını indükleyip indüklediği sorusunun cevabı, probiyotik *LGG* ve parabiyotik *İLGG* uygulamasının olası iyileştirici ve koruyucu etkisini ortaya çıkarmak için her deney grubuna ait testis kesitleri ile TUNEL metodu uygulandı. Testis kesitlerindeki apoptoz, DNA iplikçiklerindeki kırılmaların TUNEL yöntemi (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, AP, katalog no: 11684809910) ile enzimatik olarak işaretlenmesiyle belirlendi.

3.11.1. Kit Protokolü

1. TUNEL uygulaması için 5 µm kalınlığındaki kesitler ksilol yardımıyla parafinden kurtarıldı ve daha sonra derecesi azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) geçirilerek suya alındı.
2. Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonuna alınan kesitlere, +4°C'de 8 dakika boyunca % 0.1 Triton X-100 içerisinde hazırlanan sodyum sitrat solüsyonu (100 ml distile + 100 µl Triton X-100 + 0.1 gr sodyum sitrat) ile permeabilizasyon işlemi uygulandı.
3. Tekrar PBS ile yıkama işlemi yapılan kesitler, nemli ortamda, uygun dilüsyon (1:2) ve sürede TUNEL reaksiyon karışımında 37°C'de 90 dakika bekletildi. Negatif kontroller için TUNEL dilüsyon buffer (Roche, katalog no: 11966006001) ve işaretleme solüsyon karışımı (1:1) kullanıldı.
4. Sonrasında converter-AP (Roche, katalog no: 11684809910) ile 37°C'de, nemli ortamda, karanlıkta 30 dakika inkübasyon yapıldı.
5. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, Fast Red substrat solüsyonunda (Sigma, katalog no: F4648) oda sıcaklığında bekletilerek ışık mikroskopunda izlendi.
6. Mayer hematoksileni (Merck, katalog no: M105174.0500) ile zıt boyama yapıldı ve akan suda yıkama sonrasında Kaisers jelatin (Merck, katalog no: M1092420100) kullanılarak kesitler kapatıldı.

7. TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik seminifer tübül sayısının belirlenmesi için her bir testis kesitinde, TUNEL pozitif apoptotik seminifer tübül oranı (% apoptotik indeks) belirlendi.

3.12. Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) Yöntemi ile Serum Testosteron Düzeyinin Belirlenmesi

Kontrol ve deney gruplarından abdominal aorttan kan örnekleri heparinize kan tüplerine alındı. Kan örnekleri 1000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve analizler gerçekleştirilinceye kadar kan serum örnekleri -80°C'de muhafaza edildi. Testosteron seviyesinin değerlendirilmesi amacı ile Rodent Testosteron ELİSA kiti (Elabscience, katalog no: E-EL-055) üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda kullanıldı.

3.12.1. Kit Protokolü

1. Serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra stok standart çözeltisi seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek standart çalışma serisi hazırlandı (Testosteron için 20 ng/mL'lık stok standart çözeltisinden 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16; 0. ng/mL konsantrasyonlarında standart çalışma çözeltileri).
2. Standartlar (S0, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 ve S8) ve serum örnekleri 50 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
3. Tüm kuyucuklara 50 µL biotin ile işaretlenmiş antikor eklendi ve 37°C sıcaklıktaki etüvde 45 dakika inkübe edilerek inkübasyon karışımı kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra inkübasyon karışımı kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
5. Ardından, tüm kuyucuklara 90 µL Substrat reaktifi eklendi ve karanlık ortamda 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyonun ardından, tüm kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki mavi renk sarıya dönüştü.

7. Oluşan reaksiyon EPOCH microplate okuyucu (BioTek, Vermont, USA) ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Optik dansite (OD) değerleri kontrol ve deney gruplarından elde edilen serumlar için kaydedildi.
8. Standart çalışma çözeltilerinin absorbansı ile standart eğri oluşturularak serumdaki hormon seviyeleri hesaplandı. Testosteron ng/mL, birimi ile ifade edildi.

3.13. Testis Dokusunda Total Oksidan Seviye (TOS) Tayini

T1DM'de hipergliseminin neden olduğu yüksek oksidatif stres seviyesi, erkek infertilitesinin patogenezi ile doğrudan ilişkilidir (Tian ve ark., 2020). Dolayısıyla oksidatif stresi ölçmek amacıyla testis dokularında oksidan ve antioksidan seviye tayini gerçekleştirildi. Total oksidan seviye tayini, hazır ticari kit (Rel Assay Total Oxidant Status Assay, katalog no: RL0024) kullanılarak spektrofotometre (BioTek, MQX200 microplate reader) cihazıyla ölçüldü. Bu yöntemde TOS analizi kolorimetrik bir yöntem olup Ferröz (Fe^{+2}) demir kompleksinin Ferrik (Fe^{+3}) demir kompleksine okside olması temeline dayanır. Asidik ortamda ferrik demir renkli bir bileşik oluşturur (Erel, 2005). Oluşan bu renkli bileşiğin şiddeti spektrofotometre cihazında 530 nm'de ölçüldü. Ölçümün kalibrasyonu için hidrojen peroksit kullandı ve sonuçların birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L olarak ifade edildi.

Analiz için kit içeriğinde yer alan aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı;

- Standart
- Kalite kontrol-seviye 1 (L1)
- Kalite kontrol-seviye 2 (L2)
- Reaktif 1-tampon
- Reaktif 2-prokromojen

3.13.1. Kit Protokolü

- Steril 96 kuyucuklu plakaya haritalandırıldığı şekilde sırasıyla standart, L1 ve L2 solüsyonlarından ve oda ısısına getirilmiş serum örneklerinden 22,5 μl eklendi.
- Tüm kuyucukların üzerine reaktif 1 tamponundan 150 μl ilave edildi ve iyice pipetleme yapıldı.

- 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, spektrofotometrede 530 nm’de ilk absorbans değeri (A1) ölçüldü.
- Daha sonra aynı plakadaki tüm kuyucuklara reaktif 2 solüsyonundan 7,5 µl eklendi ve 5 dakika 37°C’de inkübe edildikten sonra 530 nm’deki ikinci absorbans değeri (A2) ölçüldü.

Sonuç değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

A2-A1: Standart ya da örnek absorbans (Δ Abs)

TOS (μ mol/L) = Δ Örnek Absorbans / Δ Standart Absorbans x 10

3.14. Testis Dokusunda Antioksidan Seviye (TAS) Tayini

Total antioksidan seviyenin tayini, Rel Assay Total Antioxidant Status Assay Kit kullanılarak değerlendirildi. Total antioksidan seviye tayini, hazır ticari kit (Rel Assay Total Oxidant Status Assay, katalog no: RL0017) kullanılarak spektrofotometre (BioTek, MQX200 microplate reader) cihazıyla ölçüldü. Bu yöntemde örnekte bulunan antioksidanların, koyu mavi/yeşil renkli ABTS radikali (2,2’-Azino-di-3-aehtylbenzthiazolinesulphonate) ile reaksiyona girerek, bu bileşiği rengi azalmış ABTS formuna dönüştürme esasına dayanmaktadır (Erel, 2004). Spektrofotometrede 660 nm’deki absorbans değişimi örnekteki total antioksidan düzeyi ile ilişkilidir. Ölçüm değeri, vitamin E analogu olan Trolox Equivalent olarak adlandırılan stabil antioksidan standart solüsyon ile kalibre edildi. TAS sonuçların birimi μ mol.Trolox/L olarak ifade edildi.

Analiz için kit içeriğinde yer alan aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı;

- Standart
- Kalite kontrol-seviye 1 (L1)
- Kalite kontrol-seviye 2 (L2)
- Reaktif 1-tampon
- Reaktif 2-ABTS radikal katyonu

3.14.1. Kit Protokolü

1. Steril 96 kuyucuklu plakaya haritalandırıldığı şekilde sırasıyla standart, L1 ve L2 solüsyonlarından ve oda ısısına getirilmiş serum örneklerinden 9'ar µl eklendi.
2. Devamında tüm kuyucuklara reaktif 1 tamponundan 150'şer µl ilave edildi ve pipetleme yapıldı.
3. 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, spektrofotometrede 660 nm'de ölçüldü ve elde edilen A1 değeri kaydedildi.
4. Daha sonra aynı plakadaki tüm kuyucuklara reaktif 2 solüsyonundan 22,5 µl eklendi ve 5 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra 660 nm'deki ikinci absorbans değeri ölçüldü. Bu değer A2 olarak isimlendirildi.

Sonuç değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

A2-A1: Standart, örnek ya da kör absorbans (Δ Abs)

$$TAS (mmol/L) = [(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Örnek Absorbans})] / [(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Standart Absorbans})]$$

3.15. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'nin Belirlenmesi

Dokulardaki oksidan-antioksidan dengeyi gösteren oksidatif stres indeksi değeri, TOS değerlerinin TAS değerlerine oranlaması ile bulunur ve oksidatif stres derecesinin göstergesi olarak kullanılır. OSİ, TOS ve TAS deney sonuçları üzerinden hesaplandı. OSİ hesaplanırken TAS düzeyleri µmol birimine çevrildi ve sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

TOS, µmol H₂O₂ Equiv. / L.

$$OSİ = \frac{\text{TOS}}{\text{TAS}} \times 100$$

TAS, mmol trolox Equiv. / L.

3.16. İstatistiksel Analizler

Projenin istatistiksel analizleri, Akdeniz Üniversitesi İstatistik Danışmanlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (AKİDUAM) desteği ile gerçekleştirildi. Elde edilen verilerde tüm karşılaştırmalar, öncelikle kontrol grubu ile sham grubu arasında, sonrasında kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında gerçekleştirildi. T1DM sonrasında tedavi edici ve öncesinde koruyucu amaçla oluşturulan tüm gruplar T1DM grubuna göre analiz edilirken, probiyotik *LGG* ve parabiyotik *İLGG* takviyesi verilen gruplar da kendi aralarında karşılaştırılarak istatistiksel analizler yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma değerleri ile sunuldu. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edildi. İki'den fazla grubun sayısal verileri arasındaki farkın analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi yapıldı. Anlamlı çıkan durumlarda ikili karşılaştırmalar Duncan Testi ile yapıldı. Zaman ve grup etkilerini araştırmak için İki Yönlü Varyans Analizi (Two-way ANOVA) yapıldı. Grupların zamana bağlı değişimlerini değerlendirmek amacıyla tekrarlı ölçümler ANOVA (repeated measures mixed ANOVA) analizi ile değerlendirildi. Analizler SPSS 23.0 programı ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

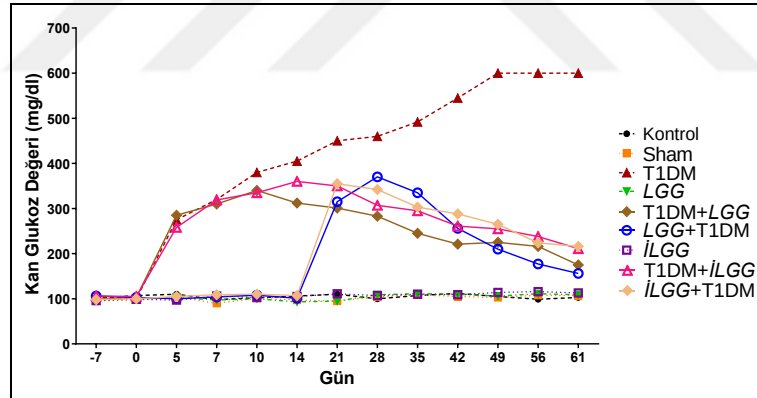
4. BULGULAR

4.1. Kan Glukoz Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Kan glukoz değerleri, deneye başlamadan 1 hafta önce ve STZ enjeksiyonunun ardından 5, 7 ve 10. günlerde ölçüldü. Devamında ölçümler haftalık olarak kaydedildi. Kan glukoz ölçümleri açısından kontrol ve sham grupları arasında herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p=0.102$). Deney grupları ölçüm günleri boyunca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubuna kıyasla T1DM grubunda STZ uygulamasının ardından deney bitimine kadar istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu izlendi ($p<0.001$). Diyabeti tedavi etmek için oluşturulan T1DM+*LGG* ve T1DM+*İLGG* gruplarında kontrol grubuna göre kan şekeri ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş olduğu görüldü ($p<0.001$). Probiyotiklerin koruyucu etkisinin değerlendirildiği *LGG*+T1DM ve *İLGG*+T1DM gruplarında, STZ uygulamasının hemen ardından istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiş olsa da ($p<0.001$) deney süresi ilerledikçe bu artışın kontrol grubuna yaklaştığı görüldü (Grup*Zaman Etkisi: $F=233,4$, $p<0.001$). Benzer şekilde kan şekeri ölçümleri açısından *LGG* grubuna kıyasla T1DM+*LGG* ve *LGG*+T1DM gruplarında, *İLGG* grubuna kıyasla da T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında STZ uygulamasının ardından istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş görülse de deney süresi ilerledikçe bu yükselişin azaldığı izlendi (**Tablo 4.1** ve **Şekil 4.1**).

Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarındaki kan glukoz ölçümlerinin (mg/dl) karşılaştırılması (ortalama± standart sapma). 0. ve 61. günler arasında haftalık ölçülen kan glukoz değerleri tabloda yer almaktadır. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. **Grup etkisi:** F=47,47 * $p<0.001$; **Zaman etkisi:** F=10,24 $p<0.001$; **Grup*Zaman Etkisi:** F=233,405 * $p<0.001$.

	Deney Öncesi	7.Gün	14.Gün	21.Gün	28.Gün	35.Gün	42.Gün	49.Gün	56.Gün	61.Gün
Kontrol	101±4,2	98±2,2	106±1,7	110±2,7	100±2,5	107±2,9	112±3,1	105±1,6	99±3,5	103±3,4
Sham	95±3,06	90±5,2	97±3,5	99±2,1	105±2,7	110±1,9	105±2,2	103±2,5	108±3,0	107±3,5
T1DM	104±4,1	*320±15,2	*405±11,0	*450±7,1	*460±2,8	*490±7,4	*600±8,3	*600±9,1	*600±0,4	*600±1,7
LGG	98±4,52,3	97±3,4	93±3,4	95±1,8	109±3,0	113±2,3	111±2,1	106±4,0	111±2,3	109±1,4
T1DM+LGG	99±1,9	*310±7,4	*312±4,4	*301±1,2	*283±8,4	*245±4,8	221±7,1	225±2,1	216±2,3	175±4,0
LGG+T1DM	106±2,03	104±3,5	101±3,6	*315±6,3	*370±3,7	*335±6,0	*256±4,2	210±7,8	177±2,4	156±9,2
İLGG	96±3,6	106±2,8	105±4,4	111±4,3	107±0,9	110±1,7	109±2,5	114±2,3	116±4,0	113±2,0
T1DM+İLGG	106±4,5	*319±8,5	*360±6,2	*350±3,7	*307±8,5	*295±6,1	*261±1,4	*255±5,5	238±9,0	211±8,8
İLGG+T1DM	98±3,6	109±3,1	107±1,3	*355±3,1	*342±3,8	*303±9,2	*288±3,6	*265±5,1	224±4,6	216±3,4



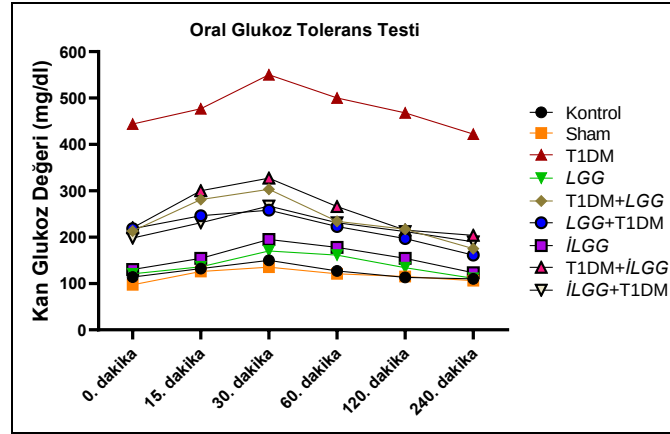
Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarına ait günlere göre kan glukoz takip grafiği sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet.

4.2. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

OGTT, hayvanların glukoz metabolizmasını düzenleyebilme yeteneğinin ve glisemik değişikliklerin değerlendirebilmesi için ölçüldü. 0, 30, 60, 90, 120. ve 240. dakikalarda kuyruk veninden alınan kanlarda yapılan OGTT ölçümlerine göre kontrol ve sham grupları arasında herhangi bir anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p=0.226$). Kontrol grubu ile T1DM, T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM grupları arasında, tüm zaman noktaları açısından yapılan değerlendirmelerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenirken ($p<0.001$), T1DM grubu ile karşılaştırıldığında T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma mevcuttu ($p<0.001$). LGG grubuna göre T1DM+LGG ve LGG+T1DM grupları, İLGG grubuna göre T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM grupları arasında ise OGTT ölçümleri anlamlı bir şekilde daha yüksek bulundu (Grup*Zaman Etkisi: $F=183,97$, $p<0.001$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarındaki OGTT'e göre kan glukoz ölçümlerinin (mg/dl) karşılaştırılması (ortalama± standart sapma). 0. ve 240. dakikalar arasında ölçülen kan glukoz değerleri tabloda yer almaktadır. (T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet). **Grup etkisi:** $F=10,25$ * $p<0.001$; **Zaman etkisi:** $F=48,41$ * $p<0.001$; **Grup*Zaman Etkisi:** $F=183,97$ * $p<0.001$.

	0. dakika	15. dakika	30. dakika	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	114±3,5	130±3,8	150±3,4	127±3,2	113±2,8	110±2,1
Sham	97±4,1	126±2,3	135±4,4	121±3,4	115±3,3	106±2,7
T1DM	*444±6,1	*477±8,1	*550±7,8	*500±6,8	*468±5,6	*422±5,3
LGG	121±2,1	136±3,4	170±4,3	161±3,1	134±2,3	111±2,2
T1DM+LGG	213±2,6	*281±5,1	*303±6,2	*234±2,6	217±2,9	175±3,3
LGG+T1DM	213±3,7	*246±3,6	*258±2,3	223±2,9	197±3,2	170±3,4
İLGG	130±4,0	154±3,2	185±2,6	178±3,0	154±4,4	123±2,1
T1DM+İLGG	*220±2,8	*300±2,9	*327±3,2	*266±3,2	215±3,2	204±2,4
İLGG+T1DM	198±1,7	*231±3,2	*267±2,1	*231±2,1	212±3,8	190±2,8



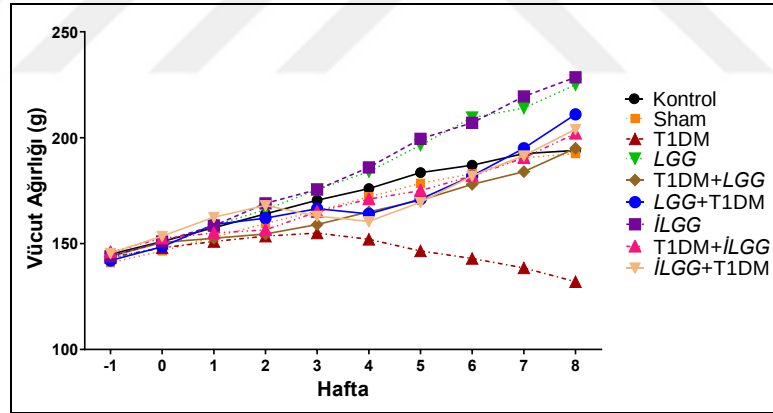
Şekil 4.2. OGTT'e göre zamana bağlı kan glukozu (mg/dl). T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+ tip 1 diyabet.

4.3. Vücut Ağırlık Ölçümleri

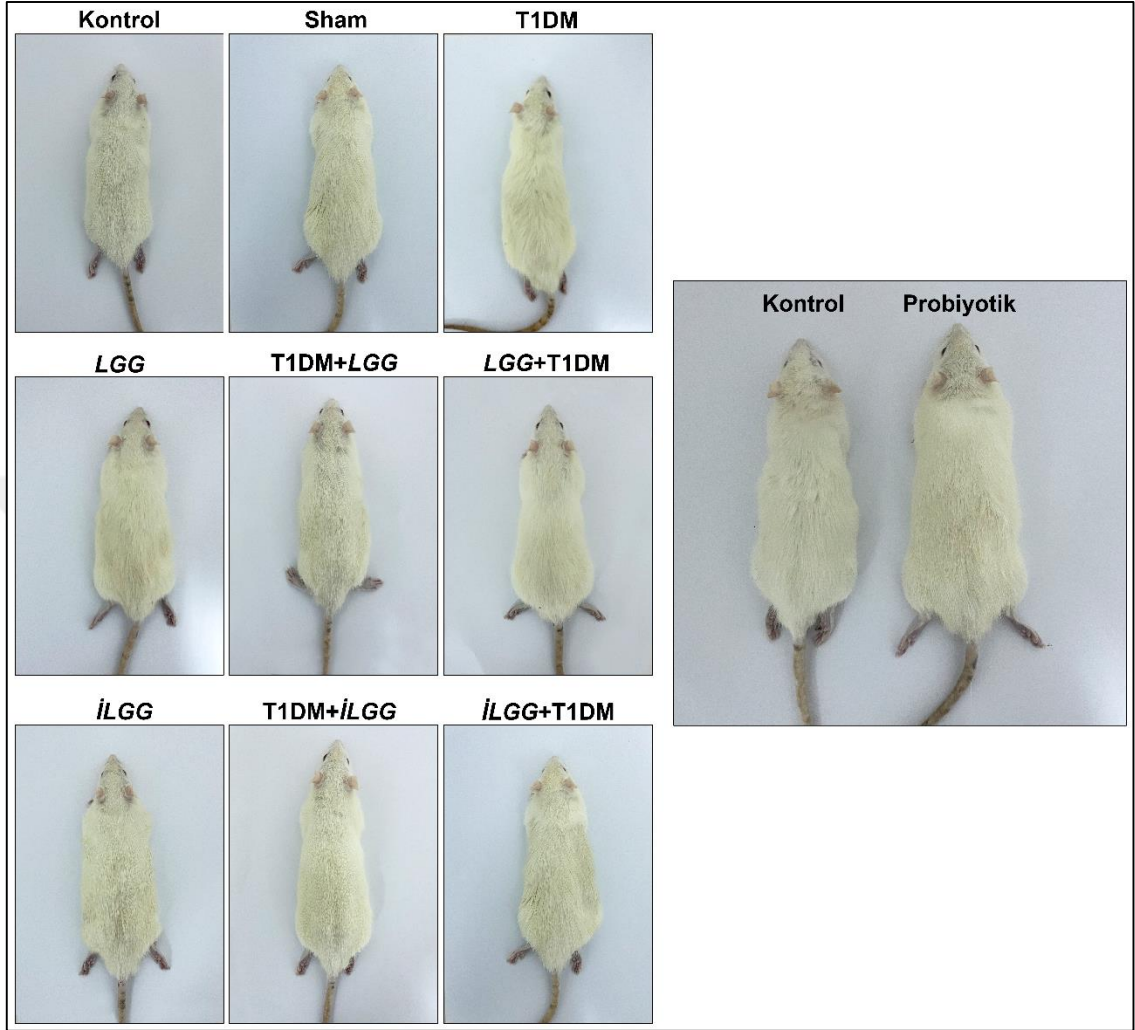
Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları 8 hafta boyunca haftalık olarak aynı saatte kaydedildi. Vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde, kontrol ve sham grupları arasında haftalık kilo alımlarında herhangi bir farklılık gözlenmedi ($p=0.319$). Kontrol grubuna kıyasla T1DM grubunda istatistiksel olarak azalış olduğu belirlenmesine rağmen LGG ve İLGG gruplarında anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Dikkat çekici bir şekilde kontrol grubuna kıyasla LGG+T1DM ve İLGG+T1DM gruplarında özellikle son haftaya doğru vücut ağırlıkları açısından anlamlı bir yükseliş belirlenirken ($p<0.001$), tedavi edici gruplar açısından herhangi bir farklılık izlenmedi ($p=0.135$) (Grup*Zaman Etkisi: $F=52,06$, $p<0,001$). **Tablo 4.3** ve **Şekil 4.3**'de takip edilen günler açısından vücut ağırlıkları tablosu ve kilo takip grafiği sunulmuştur. Kontrol grubuna göre probiyotik LGG ve İLGG uygulanan gruplarda iç organ yağlanması daha fazla olduğu da gözlemlerimiz arasında yer aldı (**Şekil 4.4** ve **Şekil 4.5**).

Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarındaki haftalık vücut ağırlıklarının (g) karşılaştırılması (ortalama±standart sapma). 0-8. haftalar arasında ölçülen kilo tartım değerleri tabloda yer almaktadır. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+*inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. **Grup etkisi:** F=84,04 * $p<0.001$; **Zaman etkisi:** F=38,96 * $p<0.001$; **Grup*Zaman Etkisi:** F=52,06 * $p<0.001$.

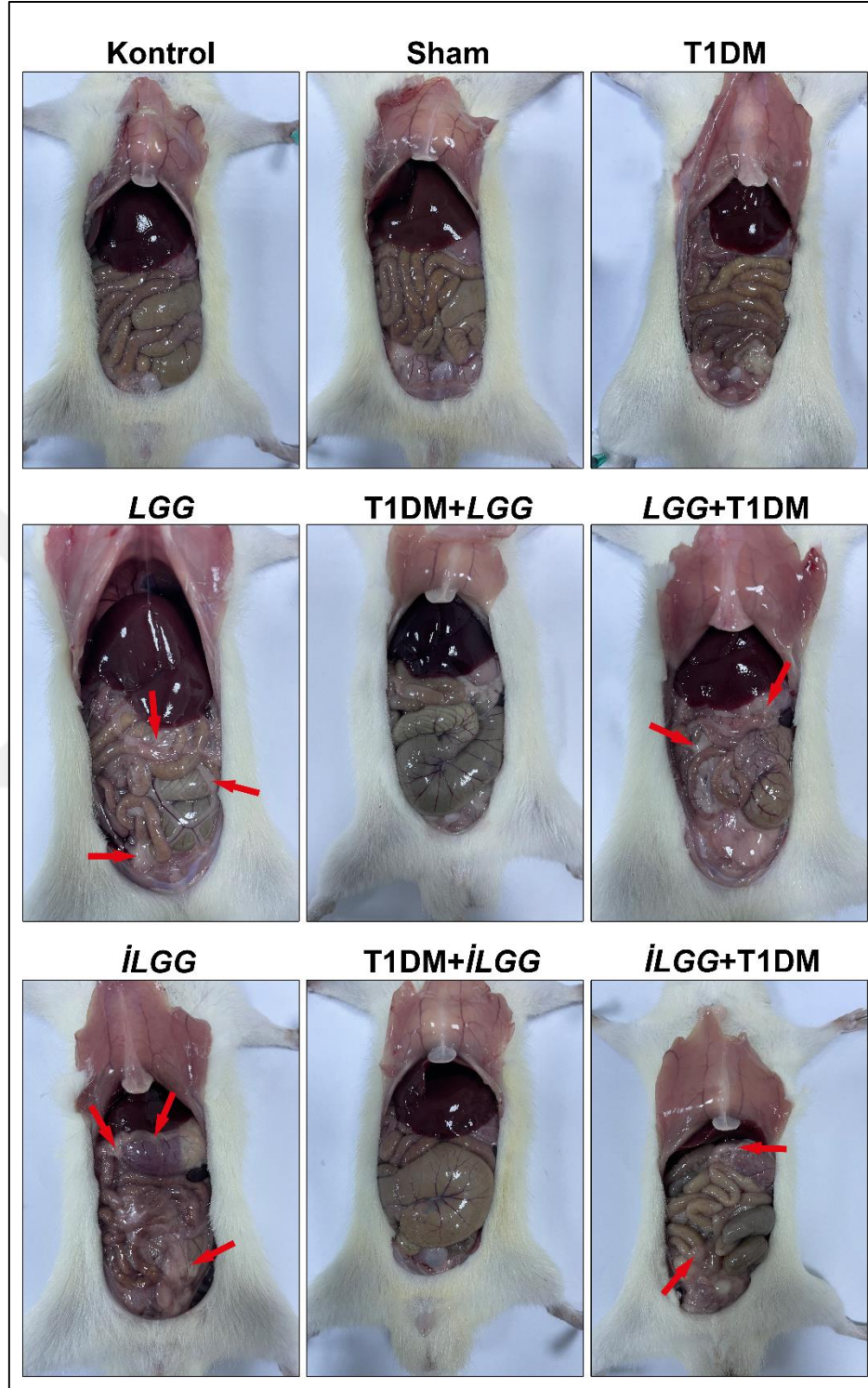
	0. hafta	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta
Kontrol	145±2,6	151±3,7	157.5±3,1	164±2,7	167±2,2	172±2,4	180±3,3	184±2,3	189±3,2
Sham	141±2,1	146.5±2,3	153±3,4	159±3,1	165±2,4	172±2,1	178±3,1	182±3,0	194±3,1
T1DM	143.5±2,9	148±3,8	151±2,9	153±3,4	155±2,7	*150±1,8	*146±2,5	*143±3,4	*138±2,6
LGG	143±2,4	148±3,4	158±3,1	166±3,7	175±2,4	*184±2,9	*199±2,9	*213±3,8	*225±3,0
T1DM+LGG	144±3,1	153±4,4	155±3,4	159±3,3	165±2,5	171±2,3	178±2,7	184±3,3	195±2,9
LGG+T1DM	141±2,9	148±3,8	159±3,5	162±3,1	167±2,1	164±2,5	182±2,3	*195±3,7	*211±2,1
İLGG	144±3,4	151±2,9	159±2,9	169±4,1	176±2,6	*189±2,3	*202±3,1	*219±2,3	*228±2,6
T1DM+İLGG	146±3,2	154±3,2	157±3,1	165±3,4	171±3,2	175±2,7	182±2,8	191±2,6	200±2,9
İLGG+T1DM	146±2,9	153±3,1	163±3,4	168±3,2	163±2,9	161±2,5	182±3,3	191±2,5	*214±3,3



Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarına ait haftalara göre vücut ağırlığı takip grafiği sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+*inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet.



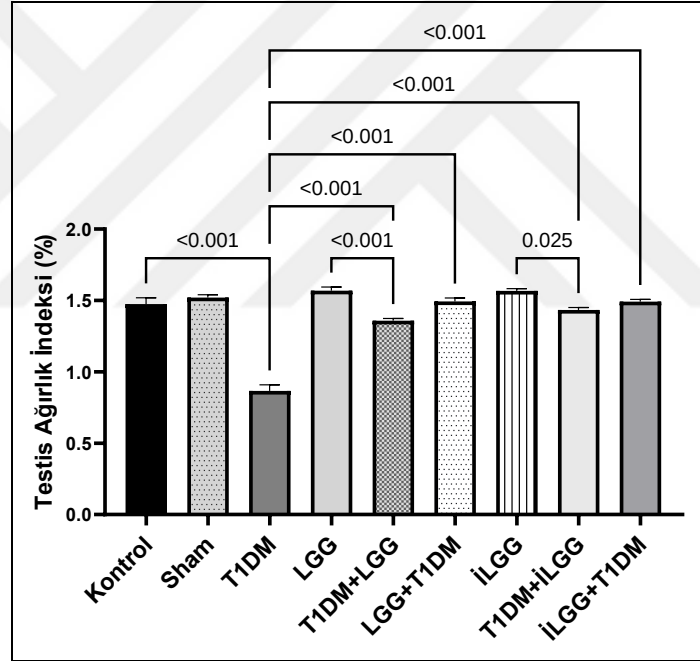
Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarına ait hayvanların vücut görüntüleri sunulmuştur. Özellikle probiyotik uygulanan gruptaki sıçanların artmış vücut ağırlıkları dikkat çekmiştir. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet.



Şekil 4.5. Kontrol ve deney grubu hayvanların iç organlarına ait görüntüler sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İç organlara ait yağlanmalar ok ile belirtilmiştir.

4.4. Testis Ağırlık İndeksinin Değerlendirilmesi

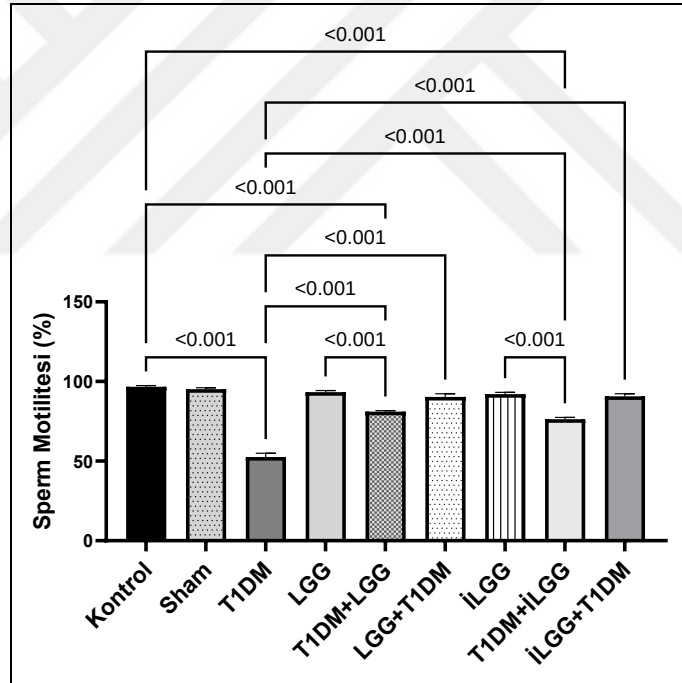
Testis ağırlık indeksi açısından kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmazken ($p=0.105$), kontrole göre T1DM grubunda testis ağırlıkları anlamlı olarak daha düşük olarak belirlendi ($p<0.001$). Bununla birlikte T1DM grubuna kıyasla T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM gruplarında testis ağırlıkları istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde daha yüksekti ($p<0.001$). Probiyotik takviyesi olarak uygulanan LGG grubuna kıyasla T1DM+LGG grubunda ($p<0.001$), İLGG grubuna kıyasla da T1DM+İLGG grubunda ($p=0.025$) testis ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olarak bulundu (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarına ait ortalama testis ağırlık indeksleri (%) sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.5. Epididimal Sperm Motilite Değerlendirmeleri

Kontrol ve sham grupları arasında epididimal sperm motiliteleri açısından, istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p=0.336$). Sperm motilite değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında T1DM, T1DM+LGG ve T1DM+İLGG gruplarında daha düşük olarak sayıldı ($p<0.001$). Sperm motiliteleri, T1DM grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi edici ve koruyucu etkinin araştırıldığı tüm gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksekti ($p<0.001$). Probiyotik ve parabiyotik gruplarının kendi içlerinde analiz edilmesi sonucunda ise LGG ve İLGG gruplarına kıyasla bu takviyelerin sadece tedavi amaçlı verildiği gruplarda sperm motilitesi açısından anlamlı bir düşüş olduğu tespit edildi ($p<0.001$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarına ait epididimal sperm motilite değerleri (%) sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+*inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

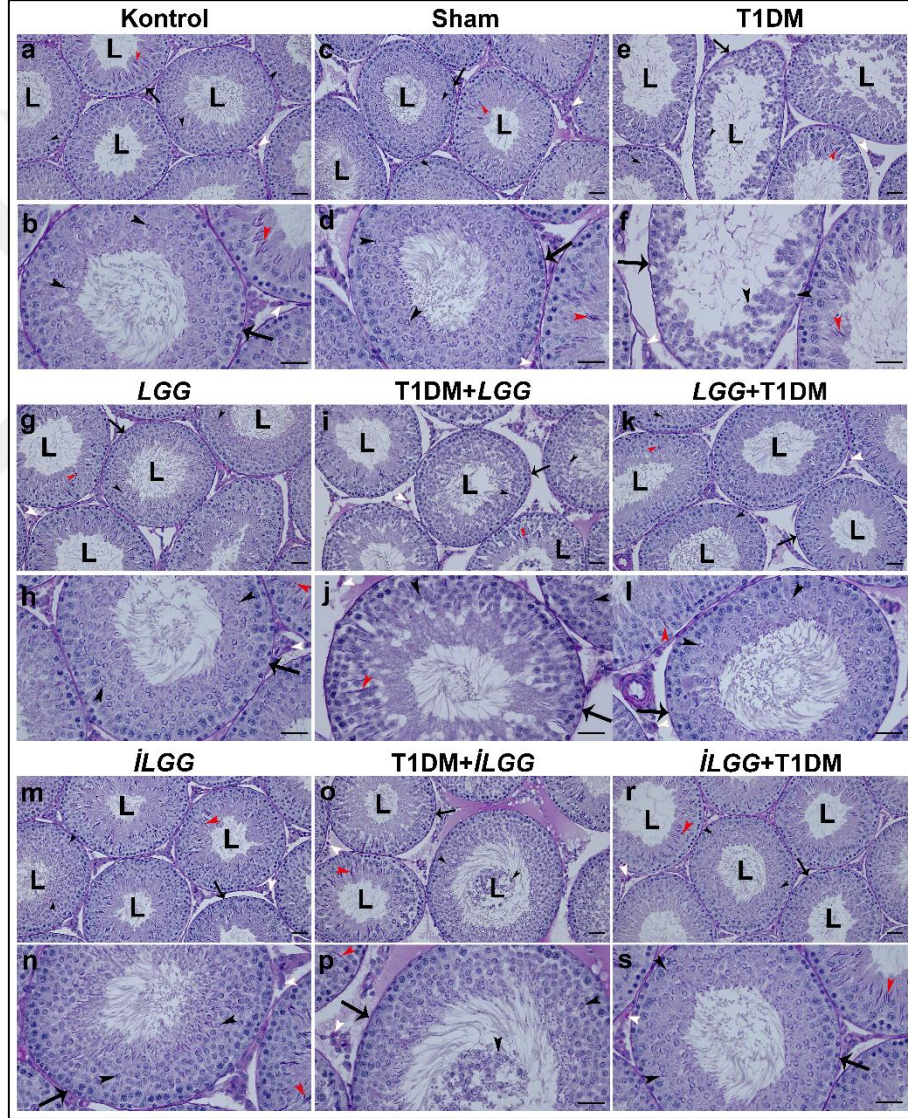
4.6. Periyodik Asit Shiff (PAS) ve Hematoksilen Eozin (H&E) boyanmaları ile Testiküler Histopatolojiye Ait Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait testiküler histopatoloji PAS ve H&E boyanmaları ile değerlendirildi. H&E boyası ile genel testis histolojisi değerlendirilirken, PAS boyası özellikle Leydig hücrelerinin, seminifer tübül bazal membranının ve akrozom yapısının incelenmesi amacıyla uygulandı.

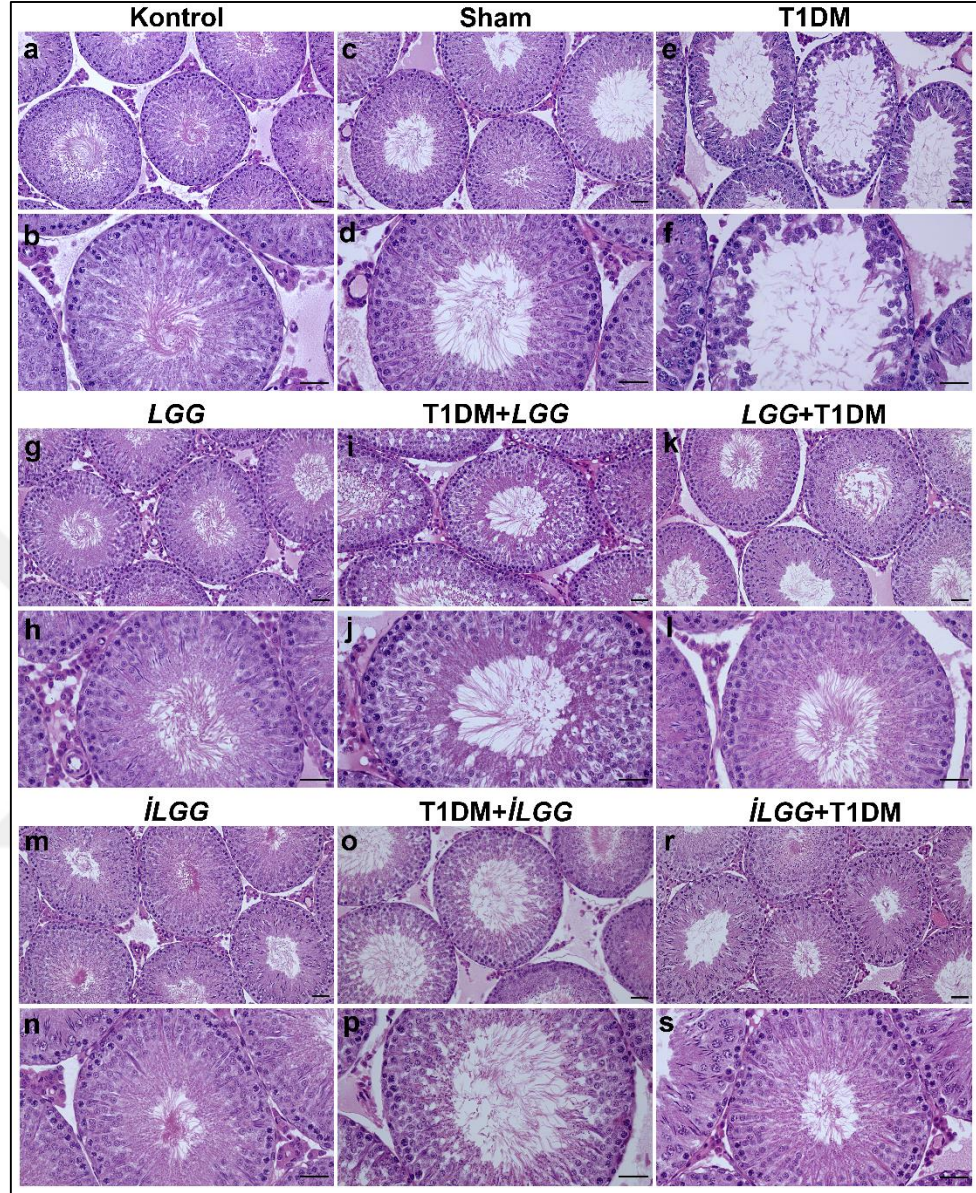
Işık mikroskopik değerlendirmelerde, kontrol ve sham grubu arasında histolojik açıdan herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p=0.174$). Kontrol grubuna benzer bir şekilde *LGG* ve *İLGG* gruplarında, testis dış yüzeyinde bulunan tunika albuginea ve seminifer tübül duvarını döşeyen spermatogenik seri hücrelerinde organizasyon bütünlüğü gözlemlendi (Şekil 4.8 ve 4.9). Bu kapsamda seminifer tübül epitelinin bazal membranından itibaren, tübül lümenine doğru spermatogenik seri hücrelerinden spermatogonyum, spermatosit, erken ve geç spermatidlerin sırasıyla yer aldığı ve spermilerin tübül lümeninde bulunduğu belirlendi. Sertoli ve Leydig hücreleri normal konumlarında izlendi. Gerek PAS gerekse H&E boyanmalarında, özellikle T1DM grubunda, seminifer tübül şekillerinde düzensizlik, bazal membrandan itibaren seminifer tübül lümenine doğru olan spermatogenik seri hücre organizasyonunda bozulmalar, hemen hemen tüm spermatogenik seri hücrelerinde vakuolizasyonlar, seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmaların bulunduğu dikkat çekti. Ayrıca tübül lümenine yakın ya da lümende, henüz olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülen immatür spermatogenik seri hücrelerinin varlığı tespit edildi. Genel olarak histolojik yapının bozulduğu sadece spermatogonyum, spermatositler ve Sertoli hücrelerinden oluşan arreste olmuş seminifer tübüllerin yanı sıra az da olsa tüm seri hücrelerini bulunduran normal seminifer tübüllerin bulunduğu da izlendi (Şekil 4.8 ve 4.9).

Diyabeti tedavi etmek amacıyla oluşturulan T1DM+*LGG* ve T1DM+*İLGG* gruplarımıza ait kesitler değerlendirildiğinde, tunika albuginea'da bütünlük, bazal membrandan tübül lümenine doğru sırası ile spermatogonyum, spermatosit, erken ve geç spermatid, spermilerin yer aldığı tübüller mevcutken, bazı seminifer tübüllerde az sayıda spermatid ve spermilerin gözlemlenebildiği ya da spermilerin hiç bulunmadığı tespit edildi. Spermatogenik

seri hücrelerinde vakuolizasyonlar ve seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrılımların bulunduğu dikkati çekse de T1DM grubundan ziyade kontrol gruplarına daha benzer bir seminifer tübül organizasyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.8 ve 4.9). Probiyotiklerin diyabete karşı koruyucu etkisinin değerlendirildiği *LGG*+T1DM ve *İLGG*+T1DM gruplarında ise histopatolojik olarak belirgin bir farklılık izlenmedi (Şekil 4.8 ve 4.9).



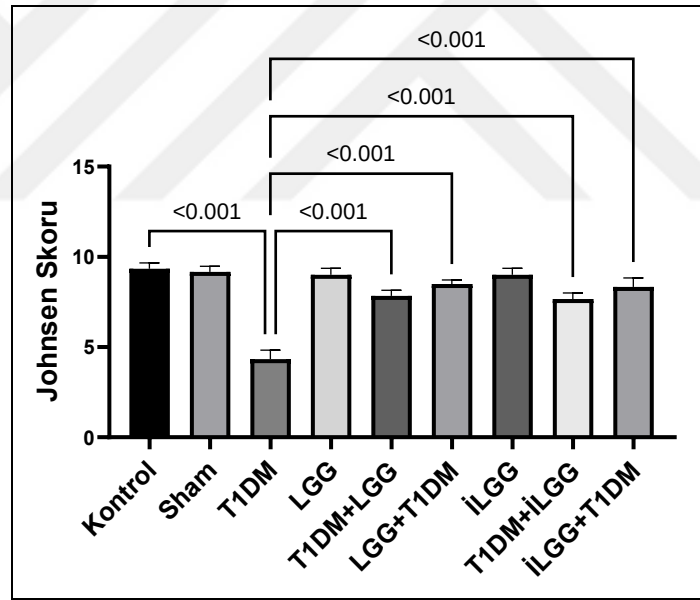
Şekil 4.8. Kontrol (a-b) sham (c-d) ve deney gruplarına (e-s) ait testis dokularındaki PAS boyanmaları sunulmuştur. Skala bar 50 μ M'yi göstermektedir. Siyah oklar bazal membranı, siyah ok başları akrozom yapısını, kırmızı oklar uzayan spermatidleri, beyaz ok başları ise Leydig hücrelerini ve L lümeni işaret etmektedir. T1DM: tip 1 diyabet (e-f), *LGG*: *Lactobacillus rhamnosus* GG (g-h), T1DM+*LGG*: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG (i-j), *LGG*+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (k-l), *İLGG*: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG (m-n), T1DM+*İLGG*: tip 1 diyabet+*inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG (o-p), *İLGG*+T1DM: *inaktif Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (r-s).



Şekil 4.9. Kontrol (a-b), sham (c-d) ve deney gruplarına (e-s) ait testis dokularındaki H&E boyanmaları sunulmuştur. Skala bar 50 µM'yi göstermektedir. T1DM: tip 1 diyabet (e-f), LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG (g-h), T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG (i-j), LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (k-l), İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (m-n), T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (o-p), İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (r-s).

4.7. Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlamasına Ait Bulgular

Testis kesitlerinde modifiye Johnsen skorlaması değerlendirildiğinde, kontrol ve sham grubu arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi ($p=0.302$). Johnsen skoru açısından kontrol grubuna ile kıyaslandığında T1DM grubunda belirgin bir azalma olduğu izlenirken ($p<0.001$), T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM gruplarında, skor değerleri T1DM grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olarak bulundu ($p<0.001$). Probiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve diyabete karşı koruyucu etkilerinin değerlendirildiği deney grupları kendi aralarında analiz edildiğinde ise LGG grubuna kıyasla T1DM+LGG ve LGG+T1DM gruplarında ($p=0.132$), İLGG grubuna kıyasla T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM grupları arasında herhangi bir farklılık yoktu ($p=0.111$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kontrol ve deney gruplarına ait Johnsen skor ortalamaları sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.8. DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve Aktif kaspaz-3 Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Testis örneklerine ait parafin kesitlerde DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve aktif kaspaz-3 proteinleri için immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilerek ekspresyon paternleri seminifer tübüllere ait hücrelerde ayrı ayrı değerlendirildi (**Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, sırasıyla**). İmmünohistokimyasal olarak analiz yapılan tüm proteinler açısından kontrol ve sham grupları arasında protein ekspresyonları ve lokalizasyon paternleri bakımından herhangi bir farklılık izlenmedi.

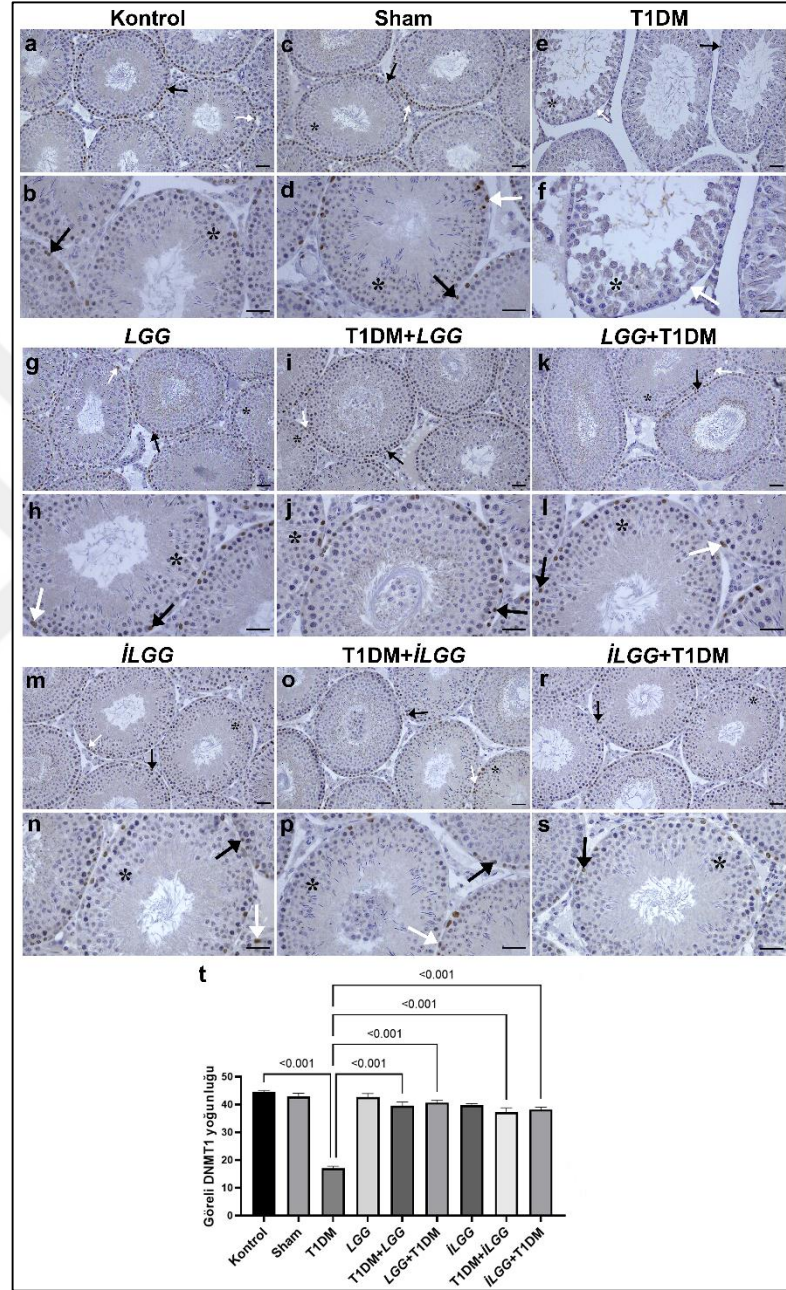
4.8.1. DNMT1 İmmünohistokimya Bulguları

DNMT1'in tüm deney gruplarında spermatogonyal hücrelerde, yuvarlak spermatidlerde ve Sertoli hücrelerinde nüklear boyanma paterni ile lokalizasyon gösterdiği dikkat çekti (**Şekil 4.11a-s**). DNMT1 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla yalnızca T1DM grubunda azalmış olduğu belirlendi ($p<0.001$). Yapılan ImageJ analizlerinde, T1DM grubuna göre T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında DNMT1 ekspresyonu açısından anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0.001$). Bununla birlikte DNMT1 ekspresyonu, *LGG* grubuna kıyasla T1DM+*LGG* ve *LGG*+T1DM gruplarında ($p=0.161$), *İLGG* grubuna kıyasla T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında ($p=0.189$) herhangi bir farklılık göstermedi (**Şekil 4.11t**).

4.8.2. DNMT3A İmmünohistokimya Bulguları

DNMT3A proteininin immünohistokimyasal lokalizasyonu değerlendirildiğinde, özellikle spermatogonyal hücrelerde ve preleptoten spermatositlerde nüklear patern sergilediği gözlemlendi. Ayrıca DNMT3A'nın, interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde ve kapiller duvarında da eksprese olduğu izlendi (**Şekil 4.12a-s**). Ekspresyon yoğunluğu açısından kontrol grubuna kıyasla T1DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.001$). T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında T1DM grubuna kıyasla anlamlı artış mevcuttu ($p<0.001$). Bununla birlikte probiyotik ve parabiyotiklerinin uygulandığı gruplar kendi aralarında analiz edildiğinde

DNMT3A ekspresyonu açısından herhangi bir farklılık izlenmedi (sırasıyla, $p=0.247$ ve $p=0.222$) (Şekil 4.12t).



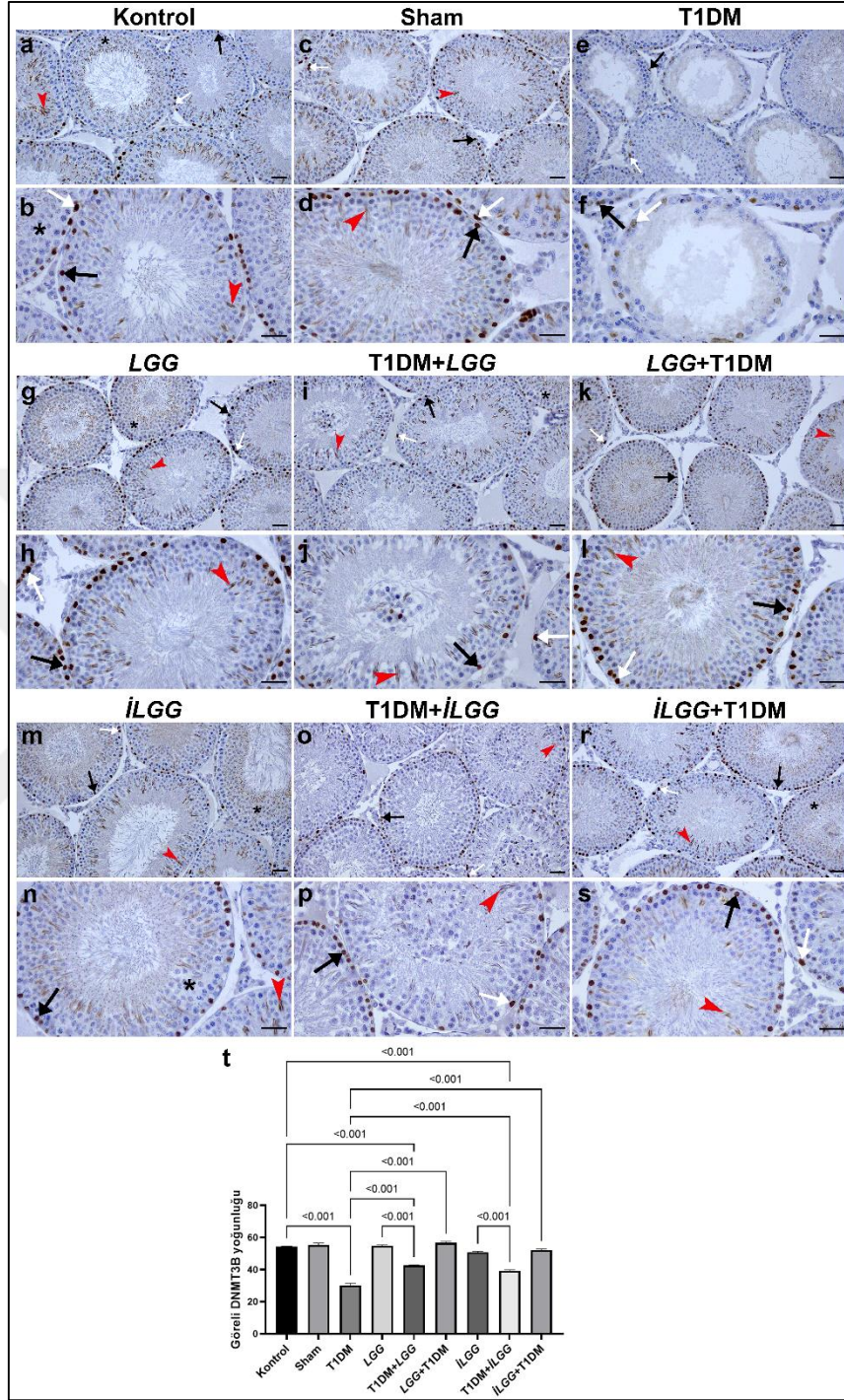
Şekil 4.11. Kontrol (a-b), sham (c-d) ve deney gruplarının (e-s) testis dokularına ait DNMT1 immüno lokalizasyonu (a-s) ve DNMT1 ekspresyonunun kontrol ve deney gruplarındaki karşılaştırılması (t) sunulmuştur. Siyah ok: spermatogonya, beyaz ok: Sertoli hücresi, yıldız: yuvarlak spermatid. Skala bar 50 μM 'yi göstermektedir. T1DM: tip 1 diyabet (e-f), LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG (g-h), T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG (i-j), LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (k-l), ILGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (m-n), T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (o-p), İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (r-s). İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.8.4. DNMT3B İmmünohistokimya Bulguları

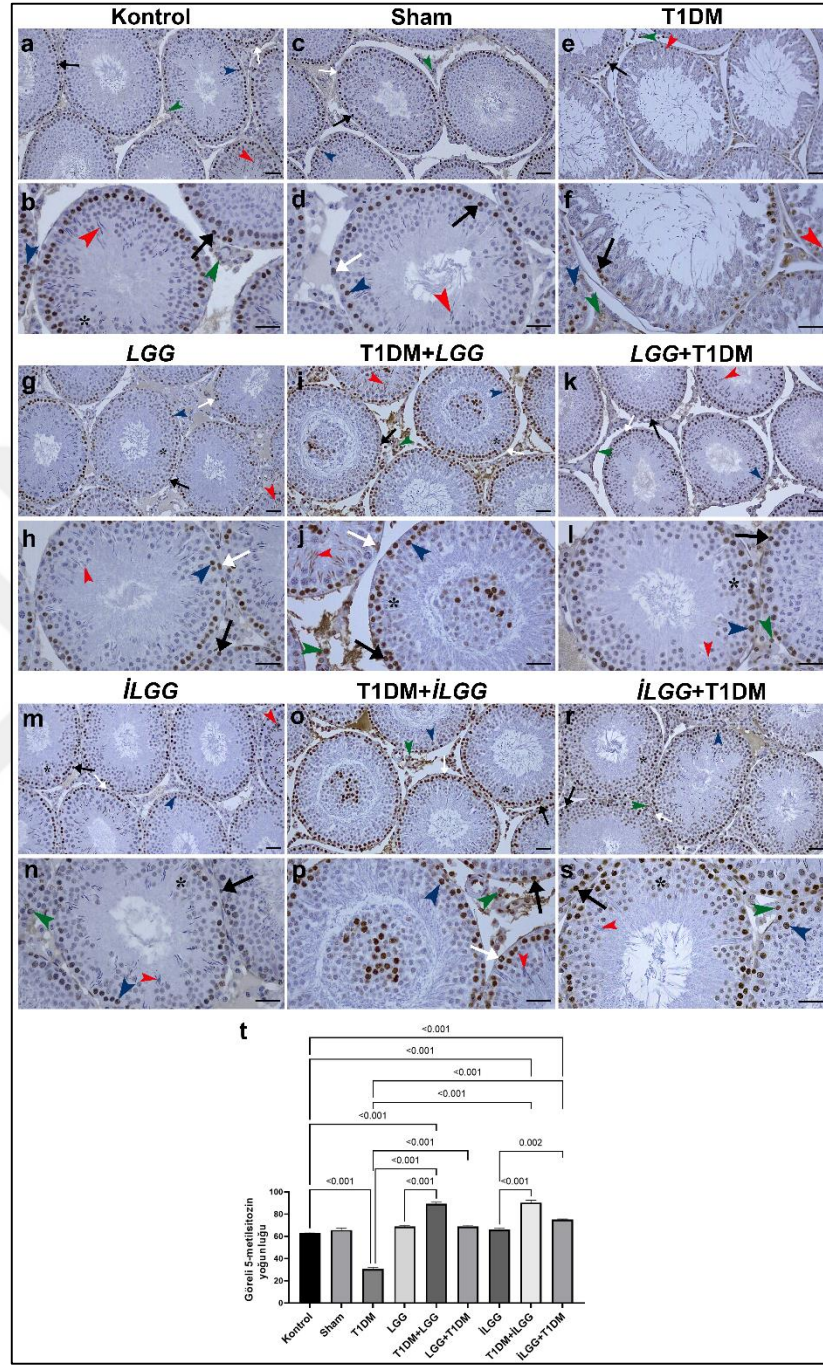
DNMT3B proteininin özellikle spermatogonyal hücreler, yuvarlak spermatidler ve bazı tübüllerde ise uzayan spermatidlerin baş kısmında nüklear ekspresyon paterni sergilediği gözlemlendi (**Şekil 4.13a-s**). DNMT3B ekspresyonunun, T1DM ($p<0.001$), T1DM+*LGG* ($p=0.002$) ve T1DM+*İLGG* ($p<0.001$) gruplarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde daha az olduğu tespit edildi. T1DM grubuna kıyasla, T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış bir DNMT3B protein ekspresyonu olduğu belirlendi ($p<0.001$). Bununla birlikte, DNMT3B protein ekspresyonu açısından, probiyotik *LGG* grupları arasında belirgin bir farklılık izlenmezken ($p=227$), *İLGG* grubuna kıyasla yalnızca T1DM+*İLGG* grubunda anlamlı bir azalma olduğu dikkat çekti ($p<0.001$) (**Şekil 4.13t**).

4.8.4. 5-Metilsitozin İmmünohistokimya Bulguları

5-metilsitozin proteininin, testiste özellikle spermatogonyal hücrelerde ve spermatositlerde, yuvarlak spermatidlerde ve bazı tübüllerde uzayan spermatidlerin baş kısmında nüklear lokalizasyon gösterdiği izlendi. Bununla birlikte interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri de 5-metilsitozin açısından immünopozitif olarak boyandı (**Şekil 4.14a-s**). Yapılan ImageJ analizlerinde 5-metilsitozin ekspresyonunun, kontrol grubuna göre T1DM grubunda anlamlı bir azalma gösterirken, T1DM+*LGG*, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$). DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B protein ekspresyonlarına benzer şekilde 5-metilsitozin ekspresyonu da T1DM grubuna kıyasla T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında daha fazlaydı ($p<0.001$). Probiyotik grubuna kıyasla T1DM+*LGG* ($p<0.001$), parabiyoetik grubuna kıyasla T1DM+*İLGG* ($p<0.001$) ve *İLGG*+T1DM ($p=0.002$) gruplarında anlamlı derecede artmış 5-metilsitozin ekspresyonu olduğu gözlemlendi. (**Şekil 4.14t**).



Şekil 4.13. Kontrol (a-b), sham (c-d) ve deney gruplarının (e-s) testis dokularına ait DNMT3B immüno lokalizasyonu (a-s) ve DNMT3B ekspresyonunun kontrol ve deney gruplarındaki karşılaştırılması (t) sunulmuştur. Siyah ok: spermatogonya, beyaz ok: Sertoli hücresi, kırmızı ok başı: uzayan spermatid, yıldız: yuvarlak spermatid. Skala bar 50 μM 'yi göstermektedir. T1DM: tip 1 diyabet (e-f), LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG (g-h), T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG (i-j), LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (k-l), İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (m-n), T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (o-p), İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (r-s). İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 4.14. Kontrol (a-b), sham (c-d) ve deney gruplarının (e-s) testis dokularına ait 5-metilsitozin immünolokalizasyonu (a-s) ve 5-metilsitozin ekspresyonunun kontrol ve deney gruplarındaki karşılaştırılması (t) sunulmuştur. Siyah ok: spermatogonya, beyaz ok: Sertoli hücresi, mavi ok başı: Sertoli hücresi, yeşil ok başı: Leydig hücresi, kırmızı ok başı: uzayan spermatid, yıldız: yuvarlak spermatid. Skala bar 50 μm'yi göstermektedir. T1DM: tip 1 diyabet (e-f), LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG (g-h), T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG (i-j), LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (k-l), İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (m-n), T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (o-p), İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (r-s). İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan *p* değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.8.5. Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimya Bulguları

Aktif kaspaz-3 proteininin testiste seminifer tübül içerisinde özellikle yuvarlak spermatidlerdeki sitoplazmik ekspresyonu dikkat çekti. Boyanma paterninin özellikle VII-VIII tübül evrelerinde yoğunlaştığı izlendi (**Şekil 4.15a-s**). Kontrol grubu ile sham grubu karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 proteini açısından herhangi bir farklılık izlenmedi ($p=0.411$). Tüm deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, özellikle T1DM ($p<0.001$), T1DM+*LGG* ($p<0.001$), T1DM+*İLGG* ($p<0.001$) ve *İLGG*+T1DM ($p=0.001$) gruplarında aktif kaspaz-3 ekspresyonunda anlamlı bir artış kaydedildi. DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve 5-metilsitozin boyanmalarının aksine T1DM grubuna kıyasla T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında aktif kaspaz-3 yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$). 5-metilsitozin ekspresyonuna benzer şekilde aktif kaspaz-3 ekspresyonu da *LGG* grubuna kıyasla T1DM+*LGG* ($p<0.001$) grubunda, *İLGG* grubuna göre ise T1DM+*İLGG* ($p<0.001$) ve *İLGG*+T1DM ($p=0.011$) gruplarında anlamlı derecede yükseldi (**Şekil 4.15t**).

4.9. DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve Aktif kaspaz-3 Proteinlerine Ait Western Blot Analizleri

Kontrol ve deney gruplarından hazırlanan testis lizatlarında DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve aktif kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri Western Blot yöntemi ile değerlendirildi ve elde edilen bantlar semikantitatif olarak analiz edildi. Bulgular, β -aktin ile normalize edilerek protein seviyeleri ImageJ programı kullanılarak karşılaştırıldı (**Şekil 4.16**). Analiz yapılan tüm proteinler açısından kontrol ve sham grupları arasında protein ekspresyon düzeyleri açısından herhangi bir farklılık izlenmedi.

DNMT1 proteininin ekspresyonu değerlendirildiğinde, deney gruplarındaki DNMT1 proteininin ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece T1DM grubunda anlamlı bir azalma mevcuttu ($p<0.001$). T1DM grubuna kıyasla, DNMT1 protein ekspresyonu T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı ($p<0.001$). Probiyotik *LGG* uygulanan gruplarda DNMT1 ekspresyon düzeyleri benzer bulunurken ($p=0.229$), *İLGG* grubuna kıyasla *İLGG*+T1DM grubunda istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşüktü ($p=0.003$) (**Şekil 4.16a, b**).

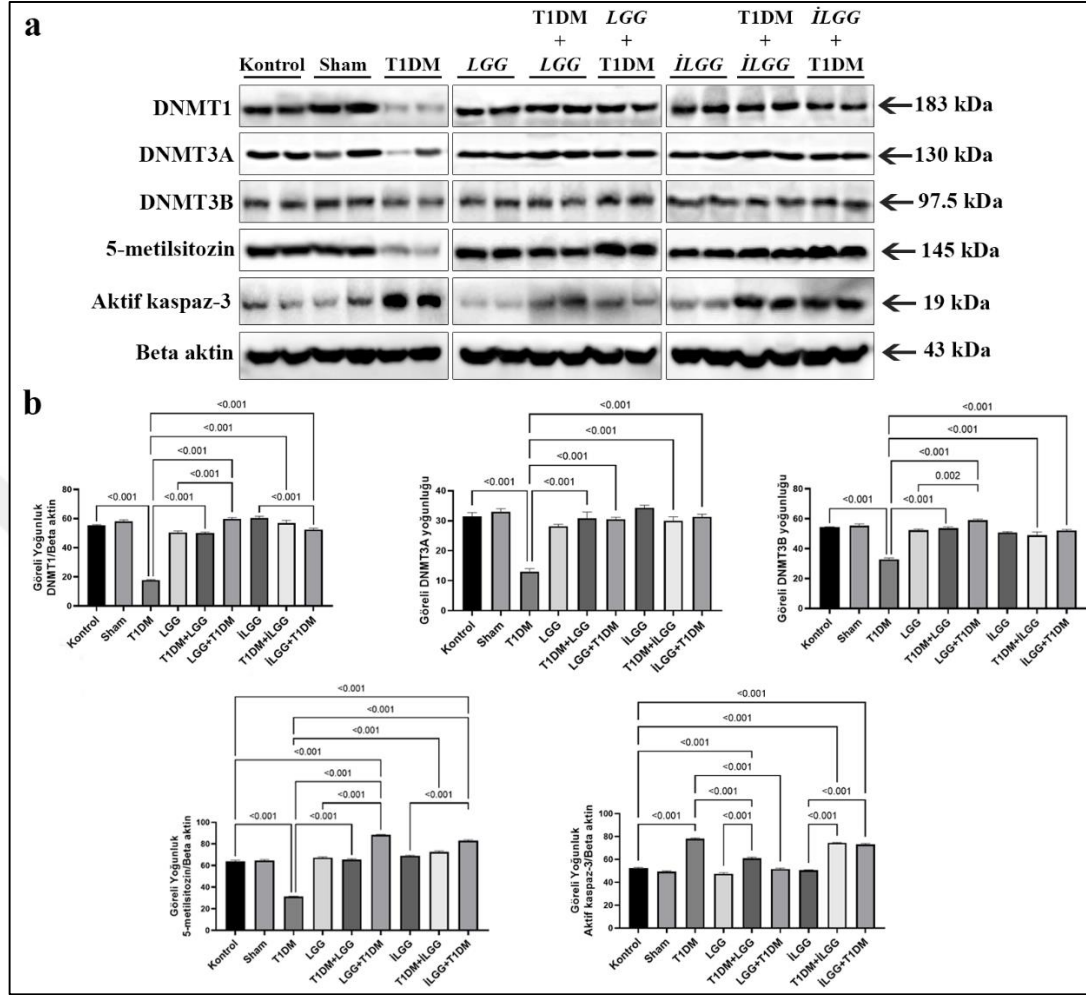
DNMT3A ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, T1DM grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p<0.001$). Bununla birlikte T1DM grubuna kıyasla, T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında daha yüksek DNMT3A ekspresyonu mevcuttu ($p<0.001$). Bu grupların aksine probiyotik ($p=0.159$) ve parabiyotik ($p=0.302$) grupları kendi aralarında analiz edildiğinde belirgin bir farklılık gözlenmedi (**Şekil 4.16a, b**).

DNMT3B protein düzeyleri açısından ise DNMT1 ve DNMT3A ekspresyonlarına benzer şekilde kontrol grubuna göre T1DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulundu ($p<0.001$). Yine DNMT1 ve DNMT3A ekspresyonlarına benzer şekilde T1DM grubuna kıyasla, T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında DNMT3B ekspresyonunun arttığı gözlemlendi ($p<0.001$). *LGG* grubuna kıyasla *LGG*+T1DM grubunda ($p=0.002$) ve T1DM+*LGG* grubuna kıyasla *LGG*+T1DM

grubunda ($p=0.029$) da DNMT3B ekspresyon düzeyi daha yüksek olarak bulundu (**Şekil 4.16a, b**).

5-Metilsitozin protein ekspresyonu T1DM grubunda anlamlı bir azalma gösterirken, *LGG*+T1DM ve *İLGG*+T1DM gruplarında istatistiksel daha yüksek olarak tespit edildi ($p<0.001$). DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B protein ekspresyon düzeylerine benzer şekilde T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarındaki 5-metilsitozin ekspresyonu, T1DM grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştı ($p<0.001$). Bununla birlikte protein ekspresyonu, *LGG* grubuna kıyasla *LGG*+T1DM grubunda, *İLGG* ve T1DM+*İLGG* gruplarına kıyasla *İLGG*+T1DM grubunda belirgin olarak daha yüksekti ($p<0.001$) (**Şekil 4.16a, b**).

Aktif kaspaz-3 protein ekspresyonları değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla T1DM, T1DM+*LGG*, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarındaki aktif kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve 5-metilsitozin proteinlerinin aksine aktif kaspaz-3 ekspresyonu, T1DM grubuna kıyasla T1DM+*LGG* ve *LGG*+T1DM gruplarında anlamlı seviyede azalmıştı ($p<0.001$). Ayrıca *LGG* grubuna kıyasla T1DM+*LGG* grubunda ve *İLGG* grubuna kıyasla T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında belirgin bir artış izlendi ($p<0.001$) (**Şekil 4.16a, b**).

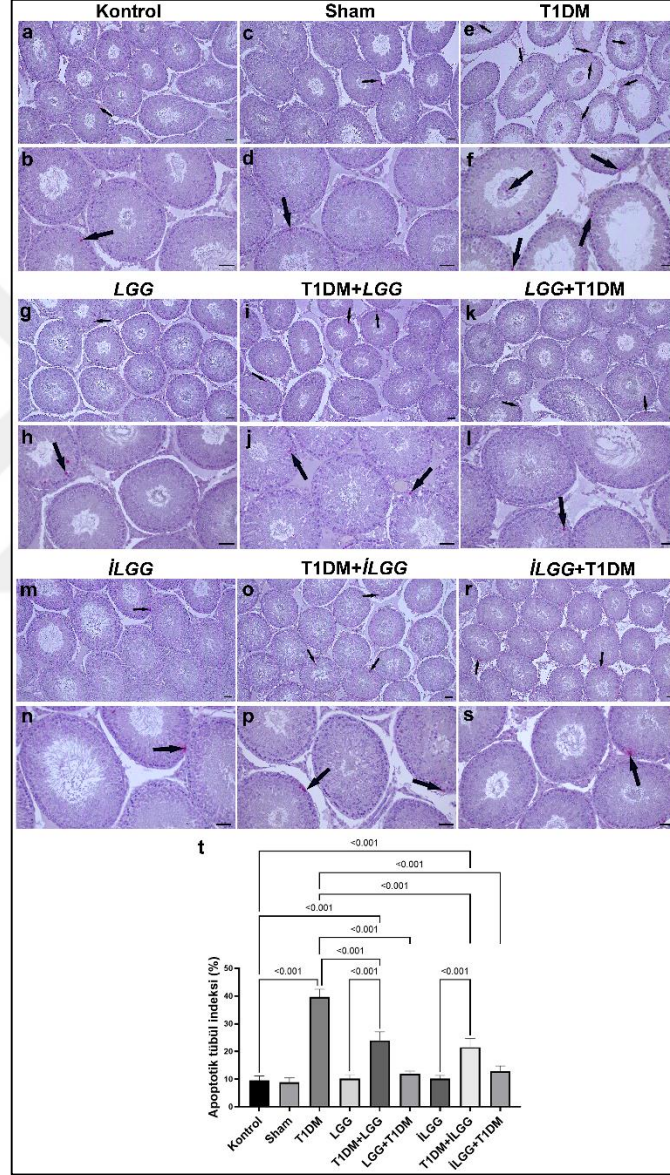


Şekil 4.16. Kontrol ve deney gruplarındaki DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, 5-metilsitozin ve aktif kaspaz-3 proteinlerine ait Western Blot bantları **(a)** ve beta aktin ile normalize edilmiş veriler grafik şeklinde **(b)** sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan *p* değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.10. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz-aracılı dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Bulguları

Apoptotik tübül indeksini hesaplayarak yapılan değerlendirmelerde, kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmadı ($p=0.147$). Apoptotik indeks değerleri özellikle T1DM, T1DM+LGG ve T1DM+İLGG gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti ($p<0.001$). Aktif kaspaz-3 ekspresyonlarına benzer şekilde, T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM gruplarında T1DM

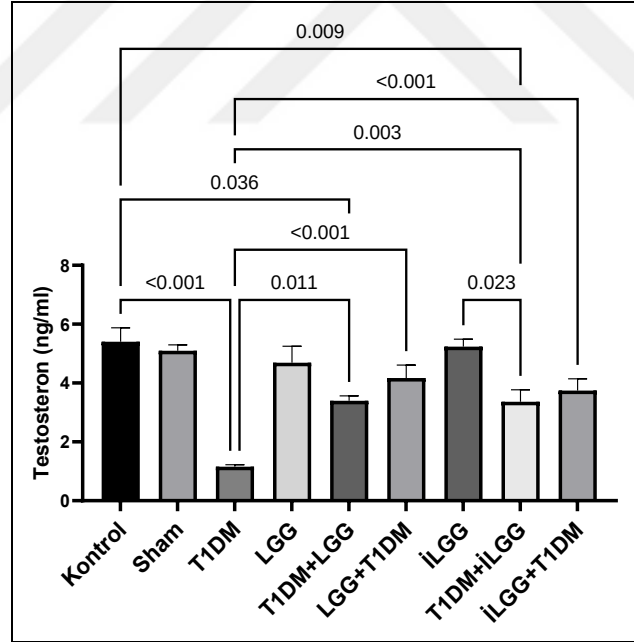
grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Bununla birlikte, *LGG* grubuna kıyasla T1DM+*LGG*, *İLGG* grubuna kıyasla da T1DM+*İLGG* gruplarındaki apoptotik indeks değerleri anlamlı seviyede daha yüksek olarak bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4.17a-t).



Şekil 4.17. Kontrol (a-b), sham (c-d) ve deney gruplarındaki (e-s) pozitif seminifer tübüller ve % apoptotik indeks değerleri grafik şeklinde (t) sunulmuştur. Skala bar 50 μM 'yi göstermektedir. Siyah ok: apoptotik hücre sinyaline sahip pozitif seminifer tübülü işaret etmektedir. T1DM: tip 1 diyabet (e-f), *LGG*: *Lactobacillus rhamnosus* GG (g-h), T1DM+*LGG*: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG (i-j), *LGG*+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (k-l), *İLGG*: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (m-n), T1DM+*İLGG*: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG (o-p), *İLGG*+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet (r-s). İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.11. Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) Yöntemi ile Testosteron Düzeylerinin Değerlendirilmesi

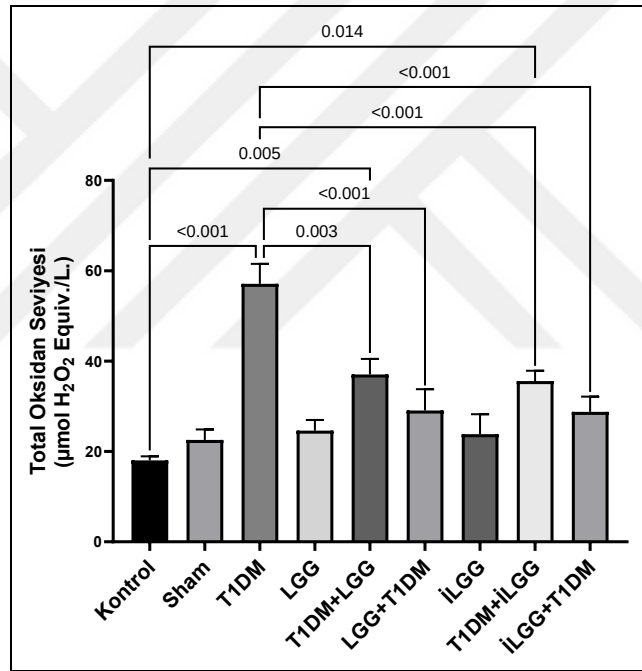
Kontrol ve sham grubuna ait serum örneklerinde testosteron için elde edilen konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p=0.364$). Kontrol grubuna kıyasla T1DM ($p<0.001$), T1DM+LGG ($p=0.036$) ve T1DM+İLGG ($p=0.009$) gruplarında testosteron düzeyleri belirgin bir şekilde daha düşüktü. T1DM grubu ile karşılaştırıldığında ise T1DM+LGG ($p=0.011$), LGG+T1DM ($p<0.001$), T1DM+İLGG ($p=0.003$) ve İLGG+T1DM ($p<0.001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. Probiyotik LGG grupları kendi aralarında analiz edildiğinde herhangi bir farklılık bulunmazken ($p=0.413$), parabiyoetik İLGG grubuna kıyasla T1DM+İLGG grubunda testosteron düzeyleri açısından belirgin bir düşüş gözlemlendi ($p=0.023$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kontrol ve deney gruplarına ait testosteron değerleri grafik halinde sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.12. Total Oksidan Seviye (TOS) Düzeylerinin Değerlendirilmesi

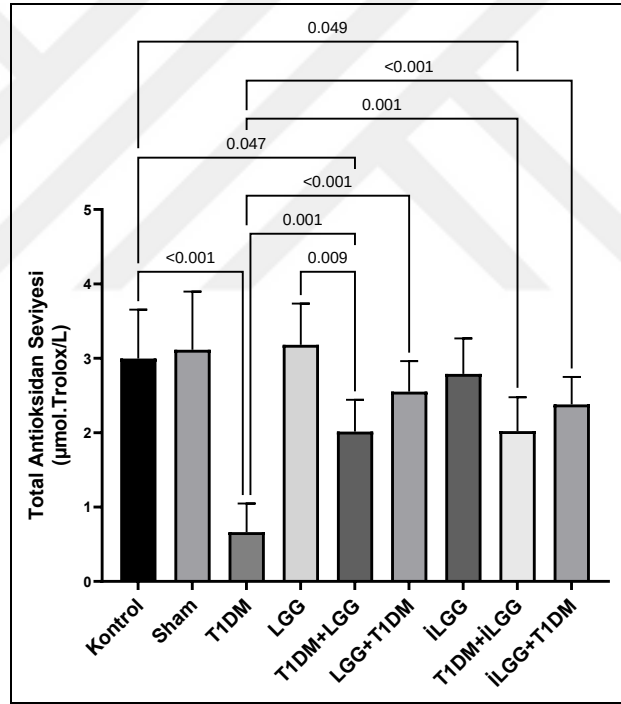
TOS düzeyleri açısından kontrol ve sham gruplarının birbirine benzer olarak bulunurken ($p=0.117$), kontrol grubuna kıyasla T1DM ($p<0.001$), T1DM+LGG ($p=0.005$) ve T1DM+İLGG ($p=0.014$) gruplarında belirgin olarak daha yüksekti. Bununla birlikte T1DM grubuna kıyasla T1DM+LGG ($p=0.003$), LGG+T1DM ($p<0.001$), T1DM+İLGG ($p<0.001$) ve İLGG+T1DM ($p<0.001$) gruplarında azalmış bir TOS düzeyi olduğu görüldü. Probiyotik ($p=0.112$) ve parabiyoetik ($p=0.417$) grupları karşılaştırıldığında ise herhangi bir farklılık kaydedilmedi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Kontrol ve deney gruplarına ait total oksidan seviyeleri grafik halinde sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.13. Total Antioksidan Seviye (TAS) Düzeylerinin Değerlendirilmesi

TAS düzeyleri açısından kontrol ve sham grupları arasında herhangi bir farklılık bulunmadı ($p=0.223$). TAS düzeyleri, özellikle T1DM ($p<0.001$), T1DM+LGG ($p=0.047$) ve T1DM+İLGG ($p=0.049$) gruplarında kontrol grubuna göre belirgin olarak daha düşüktü. TOS düzeylerinin aksine, T1DM+LGG ($p=0.001$), LGG+T1DM ($p<0.001$), T1DM+İLGG ($p=0.001$) ve İLGG+T1DM ($p<0.001$) gruplarında T1DM grubuna kıyasla TAS düzeyleri istatistiksel olarak daha yüksekti. LGG grubuna kıyasla T1DM+LGG grubunda ($p=0.009$) anlamlı bir azalma olduğu belirlenirken, İLGG grupları arasında herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p=0.209$) (Şekil 4.20).

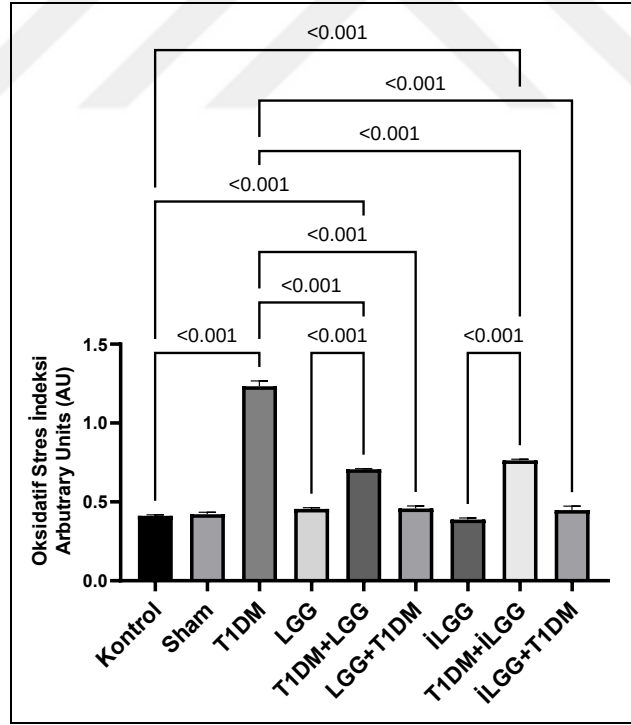


Şekil 4.20. Kontrol ve deney gruplarına ait total antioksidan seviyeleri grafik halinde sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

4.14. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'nin Değerlendirilmesi

Oksidatif stres indeksinin (OSİ) değerlendirilmesi, TOS ve TAS deney sonuçları üzerinden hesaplandı (Şekil 4.21). Hesaplama sonucunda birden küçük OSİ değeri antioksidan sistemlerin hücrelerde serbest radikallere karşı baskın durumda olduğuna, birden büyük OSİ değeri ise hücrelerin oksidatif stres altında olduğuna işaret etmektedir.

OSİ değeri açısından kontrol ve sham grupları arasında herhangi bir farklılık bulunmadı ($p=0.321$). Kontrol grubuna kıyasla T1DM, T1DM+LGG ve T1DM+İLGG gruplarında ise OSİ değerleri istatistiksel olarak daha yüksekti ($p<0.001$). Bununla birlikte, T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM gruplarına ait OSİ düzeylerinin T1DM grubuna kıyasla daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.001$). Ayrıca LGG grubuna kıyasla T1DM+LGG grubunda, İLGG grubuna kıyasla T1DM+İLGG grubunda anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Kontrol ve deney gruplarına ait oksidatif stres indeksi grafik halinde sunulmuştur. T1DM: tip 1 diyabet, LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+LGG: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, İLGG: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+İLGG: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, İLGG+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. İstatistiksel karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan p değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tip 1 Diyabetes Mellitus, pankreasın Langerhans adacıklarındaki insülin üreten beta hücrelerinin insülin eksikliğine yol açan kaybıyla karakterize, güçlü inflamatuvar bileşenlere sahip kronik bir otoimmün hastalıktır (Rodrigues Oliveira ve ark., 2023). Diyabetin çeşitli organlarda görme kaybıyla birlikte retinopati, böbrek yetmezliğine yol açan nefropati, ayak ülseri riski taşıyan periferik nöropati, kardiyovasküler semptomlar ve cinsel işlev bozuklukları gibi uzun vadeli hasarlara, işlev bozukluklarına ve yetmezliklere neden olabildiği bilinmektedir (Giri ve ark., 2018). Diyabetin diğer önemli bir komplikasyonu da erkek üreme sisteminde oluşturduğu bozukluktur (He ve ark., 2021). Diyabetik üreme bozuklukları, testislerde dejeneratif değişiklikleri, Sertoli hücrelerinde bozulmuş glukoz homeostazını, androjen biyosentezini ve salgılanmasını içermektedir (He ve ark., 2021). Diyabetik bireylerde probiyotik tüketimi ile bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilebildiği ortaya konulmuştur (Gomes ve ark., 2014). Ayrıca T1DM'li bireylerde artış gösteren bağırsak mikrobiyota disbiyozu, bu hastalıkla ilişkili epigenetik değişiklikleri etkileyebilmektedir (Al Theyab ve ark., 2020; Gradisteanu Pircalabioru ve ark., 2021). Bu noktadan hareketle çalışmamızda, STZ indüklü T1DM modeli oluşturulan erişkin sıçan testis dokularında *LGG* probiyotik uygulamasının özellikle DNA metilasyonuna bağlı epigenetik değişiklikler üzerindeki olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, STZ indüklü deneysel T1DM sıçan modelinde *LGG* probiyotik uygulaması yapılarak yetişkin testis dokularında testiküler histopatoloji, serum testosteron düzeyleri, global metilasyon paterni, DNA metiltransferazların protein düzeyinde ekspresyon ve lokalizasyonları, apoptotik indeks, oksidan ve antioksidan kapasite gibi birçok parametre açısından değerlendirme yapılmıştır (**Şekil 5.1**).

T1DM semptomlarının yaygın bir göstergesi olan vücut ağırlığı kaybı ve kan glukozunda önemli bir artışa neden olması çalışmalarla desteklenmektedir (Kahanovitz ve ark., 2017; Kaikini ve ark., 2020; Nopparat ve ark., 2023). Bu durumun temel nedeni, hücreler tarafından glukoz alımı için gerekli olan insülin üretilemediğinden, insülin yokluğunda vücut enerji için yağ ve kasları parçalayarak kilo kaybına yol açması ve hızlı kilo kaybı ile birlikte yüksek kan glukozu seviyelerinin oluşmasıdır (Merz ve ark., 2020).

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz T1DM uygulaması, birden fazla STZ enjeksiyonu ile başarılı bir şekilde uyarılarak hayvanların kan glukozları ve OGTT bulguları değerlendirildi. Bulgularımızda, literatürle de uyumlu olarak kontrol ve sham grupları arasında herhangi bir farklılık izlenmezken, kontrol grubuna kıyasla T1DM grubunda her iki parametre açısından da anlamlı bir artış olduğu rapor edildi. Literatürde probiyotikler içerisinde canlı ve ısıyla inaktive edilmiş *Lactobacillus* alt türlerinin uygulanmasının hem hayvan hem de klinik deneylerde kan şekeri, HbA1c ve insülin direnci gibi glisemik durumla ilişkili parametreleri etkileyerek diyabetin başlamasını önleyebileceği veya geciktirebileceği de belirtilmektedir (Abdelazez ve ark., 2018; Yan ve ark., 2019; Ma ve ark., 2020; Nam ve ark., 2022). Bulgularımızda kan glukozu ve OGTT açısından, diyabeti tedavi etmek amacıyla oluşturduğumuz T1DM+LGG ve T1DM+İLGG gruplarında ve probiyotiklerin koruyucu etkisini değerlendirdiğimiz LGG+T1DM ve İLGG+T1DM gruplarında kontrol grubuna göre deney başlangıcında istatistiksel olarak dikkat çeken artmaların olduğu belirlense de deney sürecinin sonlarına doğru bu değerler kontrol grubuna yaklaşmıştı. Bununla birlikte hem probiyotik hem de parabiyoitkilerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkilerinin değerlendirildiği deney gruplarımızda kan glukozu ve OGTT ölçümlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş olduğu belirlendi. Bu bulgulara ilaveten probiyotik grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde, LGG grubuna kıyasla T1DM+LGG ve LGG+T1DM, İLGG grubuna kıyasla T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM gruplarında da STZ uygulamasının ve glukoz alımının ardından kısa süreli artışlar görülse de bu diyabetik yükselişlerin deney bitimine doğru azaldığı tespit edildi. Marques ve arkadaşları, *Lactobacillus brevis* DPC 6108 (1×10^9 CFU/ml) probiyotiğinin 9 haftalık takviyesinin diyabetik sıçanlarda hiperglisemiyi hafiflettiğini raporlamıştır (Marques ve ark., 2016). Ayrıca yapılan bir çalışmada, kontrol ve T1DM sıçanların bağırsak florasında *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* gruplarının baskın olarak bulunduğu ve T1DM'yi antogonize eden *Lactobacillus* suşlarının da azalması diyabetle ilişkilendirilmiştir (Ma ve ark., 2020). Zhao ve ekibi tarafından yürütülen bir çalışmada T1DM modeli oluşturulan farelerde sinnamaldehitin koruyucu etkileri değerlendirilmiş olup, artan *Lactobacillus jonsonii* ve *Lactobacillus murinus* probiyotiklerinin doğrudan veya dolaylı olarak glukoz metabolizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini modüle edebileceği ve dolayısıyla T1DM farelerinde kan şekeri seviyesini düşürebileceği gösterilmiştir (Zhao ve

ark., 2021). İnsanlarda yapılan değerlendirmelerde ise benzer bir sonuç olarak 6-18 yaş T1DM hastalarına 6 ay boyunca *Lactobacillus salivarius salicinius* AP-32 (5×10^9 CFU/ml), *L. Johnsonii* MH-68 (5×10^9 CFU/ml) ve *Bifidobacterium animalis lactis* CP-9 (5×10^9 CFU/ml) içeren kapsül takviyelerinin uygulanması sonucunda, bu probiyotiklerin açlık kan glukozu ve HbA1c düzeylerini iyileştirdiği belirtilmiştir (Wang C. H. ve ark., 2022a). Nopparat ve arkadaşları, T1DM'li fare modelinde 8 hafta boyunca uygulanan *Lactobacillus paracasei* SD1 (1×10^9 CFU/ml) ve *Lactobacillus rhamnosus* SD11 (1×10^9 CFU/ml) probiyotiklerinin ve bu probiyotiklerin karışımının, glisemik seviyeleri, glukoz toleransını ve insülin seviyelerini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir (Nopparat ve ark., 2023). Ayrıca bu çalışmada OGTT'nin özellikle 60. ve 120. dakikalarında probiyotik verilen gruplarda, kan glukozunun azaldığı bilgisi de bulgularımızla tutarlıdır (Nopparat ve ark., 2023).

Çalışmamızda çalışılan tüm parametreler açısından kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi. Bununla birlikte vücut ağırlıkları açısından kontrol grubuna kıyasla T1DM grubunda daha düşük vücut ağırlıkları olduğu tespit edildi. Bunun aksine, *LGG* ve *İLGG* gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükselme mevcuttu. Dikkat çekici bir şekilde *LGG* ve *İLGG* gruplarında iç organ yağlanmasının artmış olması dikkat çekiciydi. Bu kapsamda Lu ve ekibi, 28 gün boyunca uyguladıkları *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 (1×10^9 CFU/ml) probiyotiğinin kontrol grubuna kıyasla T1DM'li sıçanların vücut ağırlığında azalma olduğunu ancak kontrol grubu da dahil diğer gruplarda herhangi bir farklılık belirlemediklerini rapor etmişlerdir (Lu ve ark., 2010). Benzer şekilde 3 hafta boyunca uygulanan *Lactobacillus casei Shirota* (1×10^9 - 1×10^{11} CFU/ml) probiyotik takviyesi ise T1DM'li sıçanlarda vücut ağırlığını etkilememiştir (Zarfeshani ve ark., 2011). Bu çalışmalarda diyabette görülen kilo kaybı bulgularımızı desteklese de probiyotik gruplarında fark görülmemesi bulgularımızdan farklı olup, iki çalışmada da özellikle sürenin diğer çalışmalara kıyasla çok kısa olması probiyotik etkinin görülmemesi sebebi olabilir. Bu çalışmaların aksine Chen ve ekibinin yapmış olduğu bir araştırmada, canlı ve inaktif *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus fermentum* suşlarının 8 haftalık takviyesinin diyabetli farelerin ağırlığını artırabileceği ve canlı grubun düzenleyici etkisinin ısıyla inaktive edilmiş parabiyoetik grubundan daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2018). Nopparat ve ekibine ait yeni yayınlanan bir

çalışmada, 8 hafta boyunca uygulanan *Lactobacillus paracasei* SD1 (1×10^9 CFU/ml) ve *Lactobacillus rhamnosus* SD11 (1×10^9 CFU/ml) probiyotiklerinin ve bu probiyotiklerin karışımının T1DM'li fare modelinde vücut ağırlığını etkilemediği belirtilmiştir (Nopparat ve ark., 2023). Buradaki çelişkili sonuçlar, kullanılan probiyotiklerin türüne ve dozlarındaki farklılıklara bağlı olduğunu gösteriyor olabilir.

Çalışmalar, STZ indüklü diyabetin testis ağırlıklarında azalmaya, sperm sayısı, sperm morfolojisi ve sperm motilitesinde değişiklikler gibi semen kalitesinde düşüşe neden olabileceğini göstermiştir (Das ve ark., 2021; Wang J. Y. ve ark., 2022b; Altamimi ve ark., 2023). Bulgularımızda testis ağırlık indeksi açısından, özellikle T1DM grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu rapor edildi. Çalışmamızda diyabetle birlikte uygulanan probiyotik *LGG* ve parabiyotik *İLGG* gruplarında testis ağırlığı açısından herhangi bir farklılık belirlenmedi. Bulgularımızın aksine Sheikh ve ekibinin yürüttüğü bir çalışmada da 6 hafta boyunca diyabetik sıçanlara takviye verilen *Lactobacillus acidophilus* (1×10^9 CFU/ml) uygulamasının testis ağırlığını, kontrol gruplarına kıyasla diyabetle birlikte verilen probiyotik gruplarında anlamlı düzeyde azalttığı ifade edilmiştir (Sheikh Hosseini ve ark., 2019). Epididimal sperm motilitesi bulgularımızda, kontrol grubuna göre T1DM, T1DM+*LGG* ve T1DM+*İLGG* gruplarında belirgin olarak daha düşük sperm motilitesi olduğu görüldü. Bu bakımdan gerek testis ağırlıkları gerekse epididimal sperm motilitesi değerlendirildiğinde, T1DM grubuna kıyasla T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM gruplarında istatistiksel olarak bir artış mevcuttu. Bu bulgularımızı destekler şekilde Heravan ve ekibi, diyabetik sıçanlara 8 hafta boyunca *Lactobacillus plantarum* (1×10^7 CFU/ml) takviyesinin Leydig hücre sayısını, seminifer tübül çapını, sperm hareketliliği ve sperm canlılığını arttırdığını rapor etmişlerdir (Rahimiyan-Heravan ve ark., 2020). Bu bulgunun paralelinde 2021 yılında T1DM'li sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 5 hafta boyunca *Lactobacillus casei* (1×10^9 CFU/ml) ve *Bifidobacterium lactis* (1×10^9 CFU/ml) probiyotik karışımlarının diyabetik hayvanlarda azalan testis ağırlığı, sperm sayısı ve sperm canlılığını anlamlı düzeyde arttırdığı belirtilmiştir (Keshtmand, 2021). Bununla birlikte T1DM ve probiyotiklerin sperm kalitesi üzerindeki doğrudan etkisini araştırmak, bireyler açısından çevresel standardizasyonun sağlanmasının güçlüğü ile birlikte bu tarz insan çalışmaları planlamasının zorluğunu da beraberinde getirmektedir. Bu bakımdan

T1DM koşullarında erkek infertilitesine yol açan testislerdeki sperm fizyolojisi ve diğer potansiyel belirteçlerdeki değişiklikler açısından daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda testis dokularındaki histopatolojik değerlendirmelerde, T1DM grubunda seminifer tübüllerin şekillerinde düzensizlik, bazal membrandan itibaren seminifer tübül lümenine doğru olan spermatogenik seri hücre organizasyonunda bozulmalar, hemen hemen tüm spermatogenik seri hücrelerinde vakuolizasyonlar, seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmaların bulunması dikkat çekti. Diyabeti tedavi etmek amacıyla oluşturduğumuz T1DM+*LGG* ve T1DM+*İLGG* gruplarımıza ait boyanma kesitleri değerlendirildiğinde, tunika albuginea'da bütünlük, bazal membrandan tübül lümenine doğru sırası ile spermatogonyum, spermatosit, erken ve geç spermatid, spermilerin yer aldığı tübüller mevcutken, bazı seminifer tübüllerde az sayıda spermatid ve sperm gözlenebildiği ya da spermilerin hiç bulunmadığı da gözlemlerimiz arasında yer aldı. Spermatogenik seri hücrelerinde, vakuolizasyonlar ve seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrılmaların bulunması dikkati çekse de, T1DM grubundan ziyade kontrol gruplarına daha benzer bir seminifer tübül organizasyonunun olduğu belirlendi. T1DM'in, oksidatif stres ve bozulmuş hipotalamik-hipofiz gonadal eksen üzerinden testis atrofisine, seminifer tübül ve germ hücrelerinde hasara (Leydig ve Sertoli hücreleri), spermatogenez ve seks hormonu üretiminde bozulmaya ve sperm parametrelerinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (He ve ark., 2021; Altamimi ve ark., 2023). Bununla birlikte testis histopatolojisinin değerlendirildiği farklı kapsamlı T1DM çalışmaları da bulgularımızı desteklemektedir (Sampanang ve ark., 2018; Rahimiyan-Heravan ve ark., 2020; Altamimi ve ark., 2023). Testis kesitlerinde modifiye Johnsen skorlamasına ait bulgularımız da bu değişiklikleri yansıtır bir şekilde T1DM grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma, T1DM grubuna kıyasla T1DM+*LGG*, *LGG*+T1DM, T1DM+*İLGG* ve *İLGG*+T1DM deney gruplarında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olarak raporlanmıştır.

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, DNA metilasyonunun, insanlarda ve diğer memelilerde T1DM regülasyonunda önemli olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (Zhang X. T. ve ark., 2020; Kakoki ve ark., 2021; Wang X. ve ark., 2022c). Çalışmamızda testiste DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve 5-metilsitozin proteinleri immünohistokimya

ve Western Blot yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Bilindiği üzere DNA metilasyonu, spesifik DNMT enzimleri tarafından katalize edilir. DNMT1, DNA metilasyon durumunun korunmasından, bunun tersine DNMT3A ve DNMT3B enzimleri ise yeni DNA metilasyon paternlerinin oluşturulmasından yani *de novo* metilasyonda sorumludur (Gujar ve ark., 2019). Bulgularımızda hem immünohistokimya hem de Western Blot analizlerinde DNMT1 ekspresyonu açısından, kontrol grubuna kıyasla T1DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış, T1DM grubuna kıyasla da T1DM+LGG, LGG+T1DM, T1DM+İLGG ve İLGG+T1DM deney gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış tespit edildi. Gong ve arkadaşlarına ait sıçanlar üzerinde yanık modeli oluşturulan ve probiyotik takviyelerinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, DNMT1'in hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonunun azaldığı, tedavi edici probiyotiklerin kombinasyon halinde uygulamasının ise azalan DNMT1 ekspresyonunu arttırdığı bulgusu sonuçlarımızı desteklemektedir (Gong ve ark., 2017). DNMT1 bulgumuzun aksine literatürde diyabet uygulamasının DNMT1 ekspresyonunu değiştirmedeği ya da DNMT1 ekspresyonunu arttırdığını vurgulayan çalışmalar da yer almaktadır (Tao ve ark., 2020; Zhang X. T. ve ark., 2020). DNMT1 bulgularına benzer şekilde çalışmamızda, DNMT3A ve DNMT3B ekspresyonlarının hem immünohistokimya hem de Western Blot sonuçlarında, kontrol grubuna göre sadece diyabet uygulanan grupta anlamlı düzeyde düşüş izlendi. Literatürde bu kapsamda DNA metiltransferazlara bakılan çalışmalar oldukça sınırlı olmasına rağmen, Zhang ve arkadaşları tarafından T1DM modeli oluşturulan farelerde diyabet uygulamasının DNMT3A ve DNMT3B ekspresyonlarını arttırdığı rapor edilmiştir (Zhang X. T. ve ark., 2020). Buna karşın Tao ve meslektaşlarının yürüttüğü çalışmada ise, diyabetin DNMT3A ve DNMT3B ekspresyonlarını değiştirmedeği vurgulanmıştır (Tao ve ark., 2020). Global DNA metilasyonu, bir numunedeki sitozin içeriğine göre hesaplanan toplam 5-metilsitozin seviyesidir ve yıllardır global metilasyondaki değişimlerin malignitenin temel özelliği olduğu bilinmektedir (Vryer ve ark., 2017). Literatürdeki diğer önemli bir konuda sperm metilasyon anomalilerinin idiyopatik erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu ve özellikle sperimde global metilasyon artışının ciddi sperm disfonksiyonuyla sonuçlanmasıdır (Hammoud ve ark., 2011; Krausz ve ark., 2012). Ayrıca 5-metilsitozin modifikasyonunun düzensizliği ve azalmış ekspresyonu başta diyabet olmak üzere birçok hastalıkla da

ilişkilendirilmiştir (Pfeifer ve ark., 2014; Davison ve ark., 2021; Song ve ark., 2022). Bu kapsamda immünohistokimya ve Western Blot bulgularımız 5-metilsitozin ekspresyonunun literatürle de uyumlu bir şekilde diyabet grubunda azaldığını gösterdi. Ayrıca çalışmamızda, kontrol grubuna kıyasla diyabetle birlikte koruyucu etkisine bakılan probiyotik ve parabiyotik gruplarında ise anlamlı derecede yüksek 5-metilsitozin ekspresyonunun olması dikkat çekti. Literatürde diyabet ve probiyotiklerin 5-metilsitozin üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamasına rağmen, probiyotik ve 5-metilsitozin ilişkisini araştıran insanlarda yapılan değerlendirmelerde, Vahamiko ve arkadaşları tarafından, gebelik sırasında alınan *Lactobacillus rhamnosus* GG (1×10^9 CFU/ml) ve *Bifidiobacterium lactis* Bb12 (1×10^9 CFU/ml) içeren probiyotik takviyesinin sonucunda yavruda DNA metilasyonu ve gen ifadesi değişikliklerini etkileyebileceği rapor edilmiştir (Vahamiko ve ark., 2019). Bulgularımızın aksine, Pepoyan ve ekibi, probiyotik *Lactobacillus acidophilus* uygulamasından sonra 5-metilsitozin yüzdesinde herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (Pepoyan ve ark., 2020).

Literatürde T1DM'nin testis hücreleri başta olmak üzere farklı dokularda apoptozu etkilediğine dair çalışmalar yer almaktadır (Solgi ve ark., 2021; Ali ve ark., 2022; Xu Q. ve ark., 2023). Çalışmamızda aktif kaspaz-3 proteinine ait immünohistokimya ve Western Blot sonuçları ile TUNEL bulgularımız, başta T1DM grubu olmak üzere, T1DM+LGG, ve T1DM+İLGG gruplarında pozitif boyanan seminifer tübül sayısında anlamlı düzeyde artma olduğunu ve apoptotik indeksin bu gruplarda yüksek olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, T1DM grubuna kıyasla özellikle diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkilerinin değerlendirildiği deney gruplarında istatistiksel açıdan azalış bulundu. Bulgularımızı destekleyen Wang ve ekibinin yürüttüğü bir çalışmada, T2DM'li farelerde 6 hafta boyunca uygulanan çok suşlu *Lactobacillus* içeren probiyotiklerin (1×10^8 CFU/ml) diyabet nedeniyle artan aktif kaspaz-3 düzeylerini düşürdüğünü ve apoptozu azalttığını ortaya koymuştur (Wang Y. ve ark., 2020). Bu çalışmaya ilaveten T2DM'li sıçanlarda 8 hafta boyunca takviye verilen *Lactobacillus plantarum* (1×10^7 CFU/ml) içeren probiyotiklerin aktif kaspaz-3 ekspresyon düzeylerini anlamlı şekilde azalttığı belirtilmiştir (Sefidgari-Abrasi ve ark., 2020). Sadece T2DM kapsamında değil T1DM modelinde de, sıçan dokularında artan aktif kaspaz-3 ekspresyonlarının 6 hafta boyunca uygulanan metformin ve *Lactobacillus* kombinasyonlarının (2.7×10^8 CFU/ml) başarılı bir şekilde azalttığı rapor

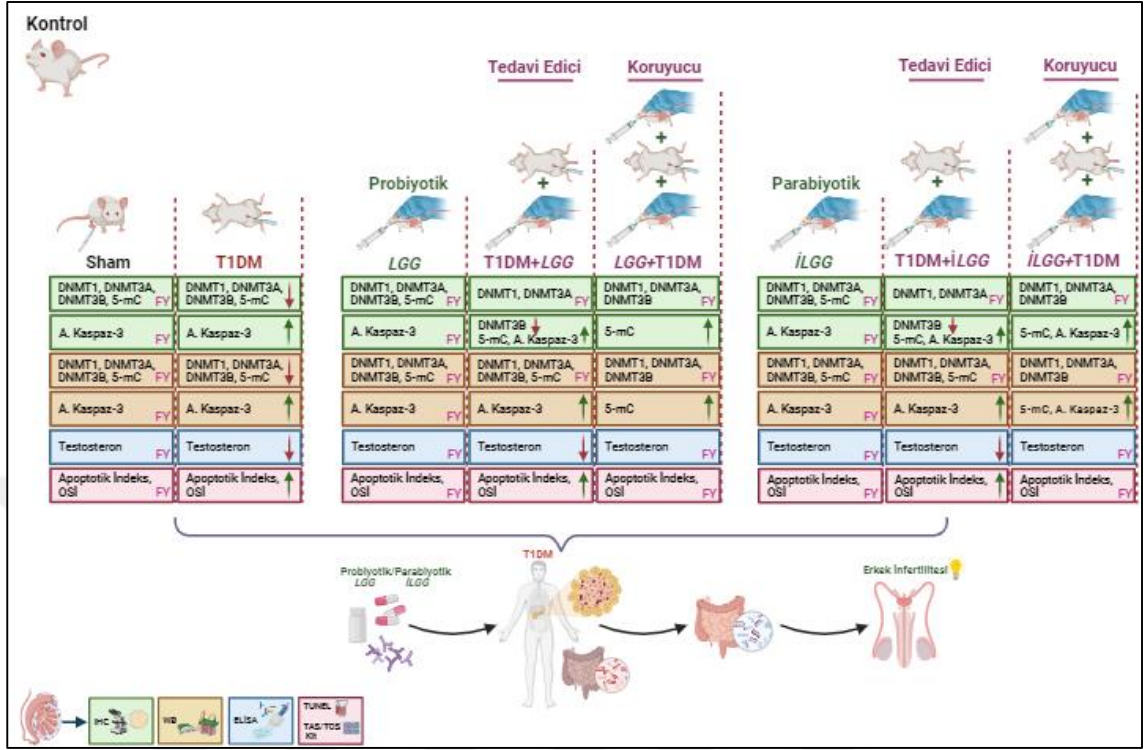
edilmiştir (El-Baz ve ark., 2021). Lin ve arkadaşları, T1DM modelinde sıçanları tedavi etmek için 4 hafta boyunca uygulanan *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 (1×10^9 CFU/ml) içeren probiyotiklerin apoptotik yolları baskıladığını bildirmiştir (Lin J. Y. ve ark., 2023). Literatürdeki çalışmaların da bulgularımızı desteklediği çalışmamız, T1DM uygulamasının testiste apoptozu tetiklediğini, diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisini test etmek amacıyla oluşturduğumuz gruplarımızın ise yükselen apoptoz seviyelerini anlamlı şekilde azalttığını göstermektedir.

Glukoz, testislerde insülin sinyalinin bozulmasını önleyen temel enerji kaynağıdır (Maresch ve ark., 2019). Sperm ve diğer testis hücrelerinde kolaylaştırılmış glukoz alımı testosteronun varlığına bağlıdır (Maresch ve ark., 2019). Serum örneklerimize ait ELİSA sonuçlarımızda, testosteron düzeylerinin T1DM, T1DM+LGG ve T1DM+İLGG gruplarında istatistiksel açıdan belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi. Bununla birlikte, diyabet grubuna kıyasla diyabetle birlikte probiyotik ve parabiyoetiklerin takviye verildiği gruplarda da istatistiksel olarak serum testosteron düzeylerinin anlamlı şekilde yükseldiği tespit edildi. Bulgularımız literatürde T1DM'nin serum testosteron düzeylerini düşürdüğünü (Das ve ark., 2021; JZ ve ark., 2021; ALTamimi ve ark., 2023) ve başta *Lactobacillus* suşları olmak üzere çeşitli probiyotik uygulamaların (Mannaa ve ark., 2005; Keshtmand ve ark., 2021; Akram ve ark., 2023) azalan testosteron hormon miktarlarını arttırdığını destekler niteliktedir.

Oksidatif stresin, insülin etkisinin bozulması ve komplikasyon görülme sıklığının artması gibi diyabet sırasında ve diyabetin ilerlemesinde önemli rol oynadığı durumlar birçok çalışmada gösterilmiştir (Abdelali ve ark., 2016; Wagner ve ark., 2021; ALTamimi ve ark., 2023). Çalışmamızda oksidatif stres belirteçleri olan TOS ve TAS düzeyleri değerlendirilerek OSI indeksi hesaplanmıştır. Oksidatif strese yönelik bulgularımızda oksidatif stresi belirten OSI değerinin, kontrol grubuna kıyasla T1DM, T1DM+LGG ve T1DM+İLGG gruplarında istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi. Bununla birlikte, OSI değerinin en yüksek olduğu diyabet grubuna kıyasla diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkilerinin değerlendirildiği deney gruplarında ise, oksidatif stresin anlamlı derecede daha düşük olduğu bulundu. Dolayısıyla çalışmamızın bulguları diyabet gibi patolojik durumlarda oksidatif stresin artabileceğini ve özellikle probiyotik/parabiyoetik takviyelerinin bu olumsuz etkiyi azaltabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımıza

benzer şekilde T1DM'nin neden olduğu oksidatif stresi farklı probiyotiklerle modüle ederek anlamlı düzeyde azaltan birkaç çalışma da literatürde yer almaktadır (Aluwong ve ark., 2016; Zare Javid ve ark., 2020; Barssotti ve ark., 2021).

STZ ile indüklenen deneysel T1DM modeli oluşturulan erişkin sıçan testis dokularında canlı ve inaktif *Lactobacillus Rhamnosus* GG probiyotik uygulamasının DNA metilasyonuna bağılı epigenetik değışiklikler üzerindeki etkisini değıerlendirdiğimiz çalışmamız, bulguları itibariyle oldukça özgün olup son yılların oldukça önemli konularından biri olarak probiyotik ve parabiyotik ilişkisini testiste DNA metilasyonu ve epigenetik değışiklikler üzerinden ortaya koymuştur. Projeden elde ettiğimiz bulguların diyabetik erkek bireylerde probiyotik uygulamasının üremeye yardımcı tedavi teknikleri ve infertilite çalışmaları kapsamında kullanımı konusundaki çalışmalara da ışık tutabileceğı düşüncesindeyiz. Dolayısıyla probiyotiklerin son yıllarda popüler olan bir konu olması ve diyabetin insan sağılığını direkt etkilemesi nedeni ile bulgularımızın konu ile ilgili olarak da literatürde yeni hipotezlerin oluşturulmasına katkı sağılayacağını düşünmekteyiz.



Şekil 5.1. Çalışmamızdaki immünohistokimya, Western Blot, ELİSA, TUNEL ve TOS/TAS analizlerine ait sonuçlar özetlenmiştir. Probiyotik *LGG* ve parabiyotik *İLGG* takviyesi, erkek infertilitesine katkıda bulunan T1DM üzerinde korucuyu ve tedavi edici etkiye sahip olabilir ve T1DM’li erkeklerde fertilitenin iyileştirilmesi için yeni ve umut verici terapötik bir yaklaşım sağlayabilir. T1DM: tip 1 diyabet, *LGG*: *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+*LGG*: tip 1 diyabet+*Lactobacillus rhamnosus* GG, *LGG*+T1DM: *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet, *İLGG*: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, T1DM+*İLGG*: tip 1 diyabet+inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG, *İLGG*+T1DM: inaktif *Lactobacillus rhamnosus* GG+tip 1 diyabet. FY: fark yok, 5-Mc: 5-metilsitozin, A. Kaspaz-3: Aktif Kaspaz-3, OSI: Oksidatif Stres İndeksi. Oklar artış ve azalışları göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. T1DM uygulaması kan glukozu ve OGTT değerlerini zamana bağımlı olarak arttırırken, probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda bu değerlerin zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür.
2. Diyabet grubu hayvanlar diyabete bağlı kilo kayıpları yaşarken, *LGG* ve *İLGG* takviyeleri hayvanlarda kilo artışı ve iç organ yağlanması ile sonuçlanmıştır.
3. Diyabet grubu hayvanların testis ağırlıklarında azalma olduğu değerlendirilirken, diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda testis ağırlıklarında herhangi bir farklılık bulunmamıştır.
4. Diyabet ve diyabeti tedavi etmek amacıyla oluşturulan gruplara ait sperm motilitesinde azalma görülmesine rağmen, probiyotik ve parabiyotiklerin tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel olarak daha yüksek sperm motilite yüzdeleri olduğu belirlenmiştir.
5. Histopatolojik değerlendirmelerde özellikle diyabet grubunda seminifer tübüllerin şekillerinde düzensizlik, spermatogenik seri hücre organizasyonunda bozulmalar, hemen hemen tüm spermatogenik seri hücrelerinde vakuolizasyonlar, seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmaların bulunduğu gözlenmiştir. Diyabeti tedavi etmek için oluşturulan gruplarda bu patolojilerin azaldığı dikkat çekerken, diyabete karşı koruyucu etkinin araştırıldığı gruplarda histolojik düzenlenim açısından belirgin bir patoloji izlenmemiştir.
6. İmmünohistokimya ve Western Blot analizlerinde DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve 5-metilsitozin (global DNA metilasyonu) ekspresyonları açısından kontrol grubuna kıyasla diyabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, diyabet grubuna kıyasla probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme olduğu tespit edilmiştir.
7. Aktif kaspaz-3 ve TUNEL bulguları, başta diyabet olmak üzere diyabeti özellikle tedavi edici etkilerin değerlendirildiği gruplarda apoptotik tübül sayısı ve indeksi açısından istatistiksel olarak artma olduğunu işaret ederken, probiyotik ve

- parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur.
8. Özellikle diyabet grubunda gözlenen düşük testosteron düzeyleri, diyabet grubuna kıyasla probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde yükselmiştir.
 9. TOS ve TAS düzeyleri kapsamında değerlendirilen ve oksidatif stresi belirten OSİ değeri en yüksek diyabet grubunda bulunurken, probiyotik ve parabiyotiklerin diyabeti tedavi edici ve koruyucu etkisinin değerlendirildiği gruplarda bu değerin oldukça azaldığı belirlenmiştir.
 10. Çalışmamızda, T1DM modelinde kan glukoz ve OGTT ölçümleri için hayvanların kuyruk veninden kan örnekleri minimal invazif olarak alınmış olup hayvanın çevreye, muameleye ve tekniğe alışması sağlanarak stres yaşaması engellenmeye çalışılmıştır. Bu nokta çalışmamızın kısıtlayıcı noktası olarak belirtilebilir. Nitekim hayvanların yaşayacağı en ufak bir stres tepkisinin, stres hormonlarını tetikleyerek salınmasına ve kan glukoz seviyelerinin yükselmesine neden olabileceği göz önüne alınmalıdır.
 11. Çalışmamızın iki temel önerisi; *LGG* ve *İLGG* takviyesi, T1DM’li erkeklerde kısmen de olsa diyabetten korunmak veya hastalığın beraberinde getirdiği patolojik etkileri azaltmak için potansiyel takviye edici terapötik bir gıda olarak kullanılabilir ve diyabet kaynaklı erkek infertilitesi kapsamında fertilitenin korunması ve iyileştirilmesine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Abdelali A, Al-Bader M, Kilarkaje N. Effects of trans-resveratrol on hyperglycemia-induced abnormal spermatogenesis, DNA damage and alterations in poly (adp-ribose) polymerase signaling in rat testis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 311: 61-73.
- Abdelazez A, Abdelmotaal H, Evivie SE, Melak S, Jia FF, Khoso MH , ve ark. Screening potential probiotic characteristics of lactobacillus brevis strains in vitro and intervention effect on type i diabetes in vivo. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 7356173.
- Adeniyi AF, Adeleye JO, Adeniyi CY. Diabetes, sexual dysfunction and therapeutic exercise: A 20 year review. *Current diabetes reviews.* 2010; 6: 201-206.
- Afifi M, Almaghrabi OA, Kadasa NM. Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on antioxidants and sperm characteristics in streptozotocin-induced diabetic rat testes. *BioMed research international.* 2015; 2015: 153573.
- Agbaje IM, McVicar CM, Schock BC, McClure N, Atkinson AB, Rogers D , ve ark. Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. *Reproductive biomedicine online.* 2008; 16: 401-409.
- Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C , ve ark. Insulin dependant diabetes mellitus: Implications for male reproductive function. *Human reproduction.* 2007; 22: 1871-1877.
- Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Sachadyn-Krol M, Varzakas T. Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms.* 2020; 8.
- Akram M, Ali SA, Kaul G. Probiotic and prebiotic supplementation ameliorates chronic restraint stress-induced male reproductive dysfunction. *Food Funct.* 2023; 14: 8558-8574.
- Al-Megrin WA, El-Khadragy MF, Hussein MH, Mahgoub S, Abdel-Mohsen DM, Taha H , ve ark. Green coffea arabica extract ameliorates testicular injury in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of diabetes research.* 2020; 2020: 6762709.
- Al-Quraishy S, Dkhil MA, Abdel Moneim AE. Anti-hyperglycemic activity of selenium nanoparticles in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of nanomedicine.* 2015; 10: 6741-6756.
- Al Theyab A, Almutairi T, Al-Suwaidi AM, Bendriss G, McVeigh C, Chaari A. Epigenetic effects of gut metabolites: Exploring the path of dietary prevention of type 1 diabetes. *Front Nutr.* 2020; 7: 563605.
- Ali AA, Essawy EA, Mohamed NS, Abdel Moneim AE, Attaby FA. *Physalis pubescens* l. Alleviates testicular disruptions associated with streptozotocin-induced diabetes in male wistar rats, rattus norvegicus. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022; 29: 12300-12312.
- AlTamimi JZ, AlFaris NA, Alshammari GM, Alagal RI, Aljabryn DH, Yahya MA. Esculeoside a alleviates reproductive toxicity in streptozotocin-diabetic rats' s model by activating nrf2 signaling. *Saudi J Biol Sci.* 2023; 30: 103780.

- Aluwong T, Ayo JO, Kpukple A, Oladipo OO. Amelioration of hyperglycaemia, oxidative stress and dyslipidaemia in alloxan-induced diabetic wistar rats treated with probiotic and vitamin c. *Nutrients*. 2016; 8.
- Alves MG, Martins AD, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue barriers*. 2013; 1: e23992.
- American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009; 32 Suppl 1: S62-67.
- American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes-2017 abridged for primary care providers. *Clin Diabetes*. 2017; 35: 5-26.
- Anamthathmakula P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraceptiondagger. *Biol Reprod*. 2020; 103: 411-426.
- Ananta E, Knorr D. Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated lactobacillus rhamnosus atcc 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiol*. 2009; 26: 542-546.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014; 383: 69-82.
- Avella MA, Place A, Du SJ, Williams E, Silvi S, Zohar Y , ve ark. Lactobacillus rhamnosus accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the gnRH and igf systems. *PloS one*. 2012; 7: e45572.
- Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: An overview. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 9478630.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011; 21: 381-395.
- Barsiah S, Behnam-Rassouli M, Shahabipour F, Rostami S, Sabbaghi MA, Momeni Z , ve ark. Evaluation of testis hormonal and histopathological alterations in type i and type ii diabetic rats. *J Cell Biochem*. 2019; 120: 16775-16785.
- Barssotti L, Abreu I, Brandao ABP, Albuquerque R, Ferreira FG, Salgado MAC , ve ark. Saccharomyces boulardii modulates oxidative stress and renin angiotensin system attenuating diabetes-induced liver injury in mice. *Sci Rep*. 2021; 11: 9189.
- Bergmann M. [spermatogenesis--physiology and pathophysiology]. *Urologe A*. 2005; 44: 1131-1132, 1134-1138.
- Bhushan S, Theas MS, Guazzone VA, Jacobo P, Wang M, Fijak M , ve ark. Immune cell subtypes and their function in the testis. *Front Immunol*. 2020; 11: 583304.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3l and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001; 294: 2536-2539.
- Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther*. 2008; 88: 1322-1335.
- Calabrese CM, Valentini A, Calabrese G. Gut microbiota and type 1 diabetes mellitus: The effect of mediterranean diet. *Front Nutr*. 2020; 7: 612773.
- Carroll M, Nevin C. Sperm DNA methylation,infertility and transgenerational epigenetics. 2015.
- Celik-Ozenci C, Tasatargil A, Tekcan M, Sati L, Gungor E, Isbir M , ve ark. Effects of abamectin exposure on male fertility in rats: Potential role of oxidative stress-

- mediated poly(adp-ribose) polymerase (parp) activation. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP. 2011; 61: 310-317.
- Chandel A, Dhindsa S, Topiwala S, Chaudhuri A, Dandona P. Testosterone concentration in young patients with diabetes. *Diabetes care*. 2008; 31: 2013-2017.
- Chang C, Lee SO, Wang RS, Yeh S, Chang TM. Androgen receptor (ar) physiological roles in male and female reproductive systems: Lessons learned from ar-knockout mice lacking ar in selective cells. *Biol Reprod*. 2013; 89: 21.
- Chaturvedi P, Tyagi SC. Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration. *Int J Cardiol*. 2014; 173: 1-11.
- Chen X, Tan F, Yi R, Mu J, Zhao X, Yang Z. Effects of lactobacillus on mice with diabetes induced by high-fat diet with streptozotocin (stz). *Applied Biosciences and Bioengineering*. 2018.
- Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev*. 2012; 64: 16-64.
- Chisholm KM, Wan Y, Li R, Montgomery KD, Chang HY, West RB. Detection of long non-coding rna in archival tissue: Correlation with polycomb protein expression in primary and metastatic breast carcinoma. *PLoS One*. 2012; 7: e47998.
- Christensen BC, Marsit CJ. Epigenomics in environmental health. *Frontiers in genetics*. 2011; 2: 84.
- Coco C, Sgarra L, Potenza MA, Nacci C, Pasculli B, Barbano R , ve ark. Can epigenetics of endothelial dysfunction represent the key to precision medicine in type 2 diabetes mellitus? *Int J Mol Sci*. 2019; 20.
- Corb Aron RA, Abid A, Vesa CM, Nechifor AC, Behl T, Ghitea TC , ve ark. Recognizing the benefits of pre-/probiotics in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus considering the influence of akkermansia muciniphila as a key gut bacterium. *Microorganisms*. 2021; 9.
- D.F. Cameron JCH. Testicular function. In. *Reference Module in Biomedical Sciences*; 2014.
- Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M , ve ark. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Lab Anal*. 2022; 36: e24093.
- Dardmeh F, Alipour H, Gazerani P, van der Horst G, Brandsborg E, Nielsen HI. Lactobacillus rhamnosus pb01 (dsm 14870) supplementation affects markers of sperm kinematic parameters in a diet-induced obesity mice model. *PloS one*. 2017; 12: e0185964.
- Das M, Annie L, Derkach KV, Shpakov AO, Gurusubramanian G, Roy VK. Expression and localization of apelin and its receptor in the testes of diabetic mice and its possible role in steroidogenesis. *Cytokine*. 2021; 144: 155554.
- Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ , ve ark. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*. 2019; 8.
- Davison GW, Irwin RE, Walsh CP. The metabolic-epigenetic nexus in type 2 diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*. 2021; 170: 194-206.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1998; 13 Suppl 1: 1-8.
- Deans C, Maggert KA. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 2015; 199: 887-896.

- Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther.* 2008; 88: 1254-1264.
- Dilworth L, Facey A, Omoruyi F. Diabetes mellitus and its metabolic complications: The role of adipose tissues. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2006; 295: 1288-1299.
- Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ , ve ark. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian journal of andrology.* 2015; 17: 948-953.
- Dkhil MA, Zrieq R, Al-Quraishy S, Abdel Moneim AE. Selenium nanoparticles attenuate oxidative stress and testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules.* 2016; 21.
- Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL. *Lactobacillus gg: Bacteriology and clinical applications.* *Gastroenterol Clin North Am.* 2005; 34: 483-498, ix.
- Drexhage HA, Dik WA, Leenen PJ, Versnel MA. The immune pathogenesis of type 1 diabetes: Not only thinking outside the cell but also outside the islet and out of the box. *Diabetes.* 2016; 65: 2130-2133.
- El-Baz AM, Shata A, Hassan HM, El-Sokkary MMA, Khodir AE. The therapeutic role of lactobacillus and montelukast in combination with metformin in diabetes mellitus complications through modulation of gut microbiota and suppression of oxidative stress. *Int Immunopharmacol.* 2021; 96: 107757.
- El-Behery EI, El-Naseery NI, El-Ghazali HM, Elewa YHA, Mahdy EAA, El-Hady E , ve ark. The efficacy of chronic zinc oxide nanoparticles using on testicular damage in the streptozotocin-induced diabetic rat model. *Acta Histochem.* 2019; 121: 84-93.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable abts radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37: 277-285.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38: 1103-1111.
- Erendor F, Eksi YE, Sahin EO, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Lentivirus mediated pancreatic beta-cell-specific insulin gene therapy for stz-induced diabetes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2021; 29: 149-161.
- FAO/DSÖ. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001.
- Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11: 4745-4767.
- Fleck D, Kenzler L, Mundt N, Strauch M, Uesaka N, Moosmann R , ve ark. Atp activation of peritubular cells drives testicular sperm transport. *Elife.* 2021; 10.
- Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: What is it telling us? *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity.* 2011; 18: 248-251.
- Franca LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology.* 2016; 4: 189-212.

- Frias-Lasserre D, Villagra CA. The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution. *Front Microbiol.* 2017; 8: 2483.
- Fuller R, Tannock G. Probiotics a critical review. 1999.
- Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols.* 2021; 1: e78.
- Gan F, Hou L, Lin Z, Ge L, Liu D, Li H, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on ochratoxin A-induced kidney injury and DNMTs expressions in piglets. *Research in veterinary science.* 2021; 139: 94-101.
- Gartner L. P. HJL. Color atlas and text of histology: Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
- Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics history. *J Clin Gastroenterol.* 2016; 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015: S116-S119.
- Ge R, Chen G, Hardy MP. The role of the Leydig cell in spermatogenic function. *Advances in experimental medicine and biology.* 2008; 636: 255-269.
- Gerber J, Heinrich J, Brehm R. Blood-testis barrier and Sertoli cell function: Lessons from *scx43ko* mice. *Reproduction.* 2016; 151: R15-27.
- Giri B, Dey S, Das T, Sarkar M, Banerjee J, Dash SK. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. *Biomed Pharmacother.* 2018; 107: 306-328.
- Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci.* 1992; 37: 121-128.
- Gomes AC, Bueno AA, de Souza RG, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J.* 2014; 13: 60.
- Gong ZY, Yuan ZQ, Dong ZW, Peng YZ. Glutamine with probiotics attenuates intestinal inflammation and oxidative stress in a rat burn injury model through altered inos gene aberrant methylation. *Am J Transl Res.* 2017; 9: 2535-2547.
- Gradisteanu P, Pircalabioru G, Corcionivoschi N, Gundogdu O, Chifiriuc MC, Marutescu LG, Ispas B, et al. Dysbiosis in the development of type I diabetes and associated complications: From mechanisms to targeted gut microbes manipulation therapies. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- Griswold MD. Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiol Rev.* 2016; 96: 1-17.
- Griswold MD. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod.* 2018; 99: 87-100.
- Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G. The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes (Basel).* 2019; 10.
- Gujral P, Mahajan V, Lissaman AC, Ponnampalam AP. Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18: 84.
- Guo Y, Du X, Bian Y, Wang S. Chronic unpredictable stress-induced reproductive deficits were prevented by probiotics. *Reproductive biology.* 2020; 20: 175-183.
- Gurung P, Yetiskul E, Jialal I. Physiology, male reproductive system. In *Statpearls.* Treasure Island (FL); 2023.

- Hadley M, Noonepalle S, Banik D, Villagra A. Functional analysis of hdacs in tumorigenesis. *Methods Mol Biol*. 2019; 1983: 279-307.
- Hakonarson H, Grant SF. Genome-wide association studies (gwas): Impact on elucidating the aetiology of diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011; 27: 685-696.
- Hamilton-Miller JMT. Probiotics: A critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 1999.
- Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod*. 2011; 26: 2558-2569.
- Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z , ve ark. Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 609722.
- Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011; 123: 2145-2156.
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013; 5: 1869-1912.
- Hashem NM, Gonzalez-Bulnes A. The use of probiotics for management and improvement of reproductive eubiosis and function. *Nutrients*. 2022; 14.
- He Z, Yin G, Li QQ, Zeng Q, Duan J. Diabetes mellitus causes male reproductive dysfunction: A review of the evidence and mechanisms. *In Vivo*. 2021; 35: 2503-2511.
- Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013; 6: 39-51.
- Hermansen K, Mortensen LS, Hermansen ML. Combining insulins with oral antidiabetic agents: Effect on hyperglycemic control, markers of cardiovascular risk and disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2008; 4: 561-574.
- Hofmann MC, McBeath E. Sertoli cell-germ cell interactions within the niche: Paracrine and juxtacrine molecular communications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 897062.
- Hu R, Zeng F, Wu L, Wan X, Chen Y, Zhang J , ve ark. Fermented carrot juice attenuates type 2 diabetes by mediating gut microbiota in rats. *Food Funct*. 2019; 10: 2935-2946.
- Huhtaniemi L, Teerds K. Male reproduction. In. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*; 2018.
- İbrahim A. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other species. In *Reference module in food science*. 2016.
- IDF DA, Seventh Edition. 2015.
- Imperatore G, Elizabeth J. Mayer-Davis, Trevor J. Orchard, Zhong. VW. Prevalence and incidence of type 1 diabetes among children and adults in the united states and comparison with non-u.S. Countries. In *Diabetes in america*. 3rd edition. 2018.
- In't Veld P. Insulitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. *Islets*. 2011; 3: 131-138.

- Jaideep S. Toor SCS. Developmental and reproductive disorders—role of endocrine disruptors in testicular toxicity. In *Reproductive and developmental toxicology* (second edition). 2017.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015; 21: 8787-8803.
- Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: A review. *Current diabetes reviews*. 2014; 10: 147-157.
- Jeltsch A, Ehrenhofer-Murray A, Jurkowski TP, Lyko F, Reuter G, Ankri S , ve ark. Mechanism and biological role of dnmt2 in nucleic acid methylation. *RNA Biol*. 2017; 14: 1108-1123.
- Jessica L, Weinstock R. Type 1 diabetes. In *Statpearls*. StatPearls; 2022.
- Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011; 2: 607-617.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *The Journal of clinical investigation*. 1969; 48: 2129-2139.
- JZ AL, AlFaris NA, Aljabryn DH, Alagal RI, Alshammari GM, Aldera H , ve ark. Ellagic acid improved diabetes mellitus-induced testicular damage and sperm abnormalities by activation of nrf2. *Saudi journal of biological sciences*. 2021; 28: 4300-4310.
- Kahanovitz L, Sluss PM, Russell SJ. Type 1 diabetes - a clinical perspective. *Point Care*. 2017; 16: 37-40.
- Kaikini AA, Dhodi D, Muke S, Peshattiwar V, Bagle S, Korde A , ve ark. Standardization of type 1 and type 2 diabetic nephropathy models in rats: Assessment and characterization of metabolic features and renal injury. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020; 12: 295-307.
- Kakoki M, Ramanathan PV, Hagaman JR, Grant R, Wilder JC, Taylor JM , ve ark. Cyanocobalamin prevents cardiomyopathy in type 1 diabetes by modulating oxidative stress and dnmt-socs1/3-igf-1 signaling. *Commun Biol*. 2021; 4: 775.
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N , ve ark. Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutr*. 2013; 2013: 481651.
- Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal*. 2018; 26: 927-939.
- Keshtmand Z. Effect of probiotics bifidobacterium lactis and lactobacillus casei on sperm parameters and expression of apoptosis bax and bcl2 genes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Probiotics & Health*. 2021.
- Keshtmand Z, Akbaribazm M, Bagheri Y, Oliaei R. The ameliorative effects of lactobacillus coagulans and lactobacillus casei probiotics on ccl4-induced testicular toxicity based on biochemical, histological and molecular analyses in rat. *Andrologia*. 2021; 53: e13908.
- Khalili L, Alipour B, Asghari Jafarabadi M, Hassanalilou T, Mesgari Abbasi M, Faraji I. Probiotic assisted weight management as a main factor for glycemic control in patients with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Diabetol Metab Syndr*. 2019; 11: 5.
- Kierszenbaum A. *Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş*. Palme Yayıncılık; 2006.

- Knip M, Honkanen J. Modulation of type 1 diabetes risk by the intestinal microbiome. *Curr Diab Rep*. 2017; 17: 105.
- Krausz C, Sandoval J, Sayols S, Chianese C, Giachini C, Heyn H , ve ark. Novel insights into DNA methylation features in spermatozoa: Stability and peculiarities. *PLoS One*. 2012; 7: e44479.
- Kumar S, Kumar R, Rohilla L, Jacob N, Yadav J, Sachdeva N. A high potency multi-strain probiotic improves glycemic control in children with new-onset type 1 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, and placebo-controlled pilot study. *Pediatr Diabetes*. 2021; 22: 1014-1022.
- Lam CJ, Jacobson DR, Rankin MM, Cox AR, Kushner JA. Beta cells persist in t1d pancreata without evidence of ongoing beta-cell turnover or neogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102: 2647-2659.
- Lanciotti L, Cofini M, Leonardi A, Penta L, Esposito S. Up-to-date review about minipuberty and overview on hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation in fetal and neonatal life. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 410.
- Langford GA, Heller CG. Fine structure of muscle cells of the human testicular capsule: Basis of testicular contractions. *Science*. 1973; 179: 573-575.
- Lazar M, Golden P, Furman M, Lieberman TW. Resistance of the rabbit to streptozotocin. *Lancet*. 1968; 2: 919.
- Lebeer S, Claes I, Tytgat HL, Verhoeven TL, Marien E, von Ossowski I , ve ark. Functional analysis of lactobacillus rhamnosus gg pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78: 185-193.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 216-226.
- Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and tissue research*. 2005; 322: 33-41.
- Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM , ve ark. Targeted disruption of dnmt1, dnmt3a and dnmt3b in human embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2015; 47: 469-478.
- Liebers R, Rassoulzadegan M, Lyko F. Epigenetic regulation by heritable rna. *PLoS Genet*. 2014; 10: e1004296.
- Lin JB, Troyer D. Testicular anatomy and physiology. 2014.
- Lin JY, Tsai BC, Kao HC, Chiang CY, Chen YA, Chen WS , ve ark. Neuroprotective effects of probiotic lactobacillus reuteri gmn1-263 in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023; 15: 1287-1297.
- Liu Q, Liu Y, Li F, Gu Z, Liu M, Shao T , ve ark. Probiotic culture supernatant improves metabolic function through fgf21-adiponectin pathway in mice. *J Nutr Biochem*. 2020; 75: 108256.
- Loeken MR. A new role for pancreatic insulin in the male reproductive axis. *Diabetes*. 2012; 61: 1667-1668.
- Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J. Live and ultraviolet-inactivated lactobacillus rhamnosus gg decrease flagellin-induced interleukin-8 production in caco-2 cells. *J Nutr*. 2008; 138: 2264-2268.
- Lu YC, Yin LT, Chang WT, Huang JS. Effect of lactobacillus reuteri gmn1-263 treatment on renal fibrosis in diabetic rats. *J Biosci Bioeng*. 2010; 110: 709-715.

- Luís Rato MGA, Sílvia Socorro, José E. Cavaco and Pedro F. Oliveira*. Blood testis barrier: How does the seminiferous epithelium feeds the developing germ cells? ; 2012.
- Ma Q, Li Y, Wang J, Li P, Duan Y, Dai H , ve ark. Investigation of gut microbiome changes in type 1 diabetic mellitus rats based on high-throughput sequencing. *Biomed Pharmacother.* 2020; 124: 109873.
- Maddaloni E, Bolli GB, Frier BM, Little RR, Leslie RD, Pozzilli P , ve ark. C-peptide determination in the diagnosis of type of diabetes and its management: A clinical perspective. *Diabetes Obes Metab.* 2022; 24: 1912-1926.
- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: Their structure and function. *Arch Histol Cytol.* 1996; 59: 1-13.
- Mannaa F, Ahmed HH, Estefan SF, Sharaf HA, Eskander EF. *Saccharomyces cerevisiae* intervention for relieving flutamide-induced hepatotoxicity in male rats. *Pharmazie.* 2005; 60: 689-695.
- Maresch CC, Stute DC, Fleming T, Lin J, Hammes HP, Linn T. Hyperglycemia induces spermatogenic disruption via major pathways of diabetes pathogenesis. *Sci Rep.* 2019; 9: 13074.
- Maresch CC, Stute DC, Ludlow H, Hammes HP, de Kretser DM, Hedger MP , ve ark. Hyperglycemia is associated with reduced testicular function and activin dysregulation in the *ins2(akita+/-)* mouse model of type 1 diabetes. *Molecular and cellular endocrinology.* 2017; 446: 91-101.
- Marques TM, Patterson E, Wall R, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Cotter PD , ve ark. Influence of gaba and gaba-producing *Lactobacillus brevis* dpc 6108 on the development of diabetes in a streptozotocin rat model. *Benef Microbes.* 2016; 7: 409-420.
- Merz KE, Thurmond DC. Role of skeletal muscle in insulin resistance and glucose uptake. *Compr Physiol.* 2020; 10: 785-809.
- Mescher A. *Junqueira temel histoloji konu ve atlas.* Güneş Tıp Kitapevleri; 2019.
- Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 2014; 28: 812-828.
- Mishra SP, Wang S, Nagpal R, Miller B, Singh R, Taraphder S , ve ark. Probiotics and prebiotics for the amelioration of type 1 diabetes: Present and future perspectives. *Microorganisms.* 2019; 7.
- Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Influence for testicular development and histological peculiarity in the testes of flutamide-induced cryptorchid rat model. *Int J Urol.* 2007; 14: 67-72.
- Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Hosseini Fard H, Ghojzadeh M. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: A systematic review and meta-analysis. *Health Promot Perspect.* 2020; 10: 98-115.
- Monteiro SS, Schnorr CE, Pasquali MAB. Paraprobiotics and postbiotics-current state of scientific research and future trends toward the development of functional foods. *Foods.* 2023; 12.
- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38: 23-38.

- Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiol Lett.* 2012; 334: 1-15.
- Nam Y, Yoon S, Baek J, Kim JH, Park M, Hwang K, et al. Heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* lrc5314 mitigates the effects of stress-related type 2 diabetes in mice via gut microbiome modulation. *J Microbiol Biotechnol.* 2022; 32: 324-332.
- Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, Yadav H. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact.* 2020; 19: 168.
- Nazir Y, Hussain SA, Abdul Hamid A, Song Y. Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol, and allergic and hiv diseases. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 3428437.
- Noble JA, Valdes AM. Genetics of the hla region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011; 11: 533-542.
- Nopparat J, Khuituan P, Peerakietkhajorn S, Teanpaisan R. Probiotics of *Lactocaseibacillus paracasei* sd1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* sd11 attenuate inflammation and beta-cell death in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *PLoS One.* 2023; 18: e0284303.
- Nora M, Aboud A, Tupper C, Jialal I. Genetics, epigenetic mechanism. *StatPearls.* 2022.
- Oh SJ, Lee JK, Shin OS. Aging and the immune system: The impact of immunosenescence on viral infection, immunity and vaccine immunogenicity. *Immune Netw.* 2019; 19: e37.
- Olsen JA, Kenna LA, Spelius MG, Hessner MJ, Akirav EM. Circulating differentially methylated amylin DNA as a biomarker of beta-cell loss in type 1 diabetes. *PloS one.* 2016; 11: e0152662.
- Oridupa OA, Folasire OF, Owolabi AJ, Aina O. Effect of traditional treatment of diabetes mellitus with *xanthosoma sagittifolium* on the male reproductive system of alloxan-induced diabetic wistar rats. *Drug research.* 2017; 67: 337-342.
- Othman MS, Hafez MM, Abdel Moneim AE. The potential role of zinc oxide nanoparticles in micrnas dysregulation in stz-induced type 2 diabetes in rats. *Biological trace element research.* 2020; 197: 606-618.
- Ou CC, Lin SL, Tsai JJ, Lin MY. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward th1 polarization. *J Food Sci.* 2011; 76: M260-267.
- Park KY, Kim B, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnosus* gg improves glucose tolerance through alleviating er stress and suppressing macrophage activation in db/db mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2015; 56: 240-246.
- Pepoyan AZ, Tsaturyan VV, Badalyan M, Weeks R, Kamiya S, Chikindas ML. Blood protein polymorphisms and the gut bacteria: Impact of probiotic *Lactobacillus acidophilus* narine on salmonella carriage in sheep. *Benef Microbes.* 2020; 11: 183-189.
- Perrard MH, Sereni N, Schluth-Bolard C, Blondet A, SG DE, Plotton I, et al. Complete human and rat ex vivo spermatogenesis from fresh or frozen testicular tissue. *Biol Reprod.* 2016; 95: 89.
- Pfeifer GP, Xiong W, Hahn MA, Jin SG. The role of 5-hydroxymethylcytosine in human cancer. *Cell Tissue Res.* 2014; 356: 631-641.

- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365: 1663-1678.
- Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv Nutr.* 2019; 10: S49-S66.
- Rahimiyan-Heravan M, Roshangar L, Karimi P, Sefidgari-Abrasi S, Morshedi M, Saghafi-Asl M, ve ark. The potential therapeutic effects of lactobacillus plantarum and inulin on serum and testicular reproductive markers in diabetic male rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2020; 12: 53.
- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (nsc-37917). *Cancer chemotherapy reports.* 1963; 29: 91-98.
- Rodrigues Oliveira SM, Rebocho A, Ahmadpour E, Nissapatorn V, de Lourdes Pereira M. Type 1 diabetes mellitus: A review on advances and challenges in creating insulin producing devices. *Micromachines (Basel).* 2023; 14.
- Ross MH PW. Histoloji konu anlatımı ve atlas. Palme Yayıncılık; 2017.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 81-120.
- Saeedi P, Salpea P, Karuranga S, Petersohn I, Malanda B, Gregg EW , ve ark. Mortality attributable to diabetes in 20-79 years old adults, 2019 estimates: Results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020; 162: 108086.
- Sampannang A, Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Iamsaard S. Testicular histopathology and phosphorylated protein changes in mice with diabetes induced by multiple-low doses of streptozotocin: An experimental study. *Int J Reprod Biomed.* 2018; 16: 235-246.
- Sanders ME. Probiotics in 2015: Their scope and use. *J Clin Gastroenterol.* 2015; 49 Suppl 1: S2-6.
- Saul M, Genuth M, Jerry P, Palmer M, David M, Nathan M. Classification and diagnosis of diabetes. In. *Diabetes in America.* 3rd edition.; 2018.
- Sawada D, Sugawara T, Ishida Y, Aihara K, Aoki Y, Takehara I , ve ark. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with lactobacillus gasseri cp2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. *Food research international.* 2016; 79.
- Schoeller EL, Chi M, Drury A, Bertschinger A, Esakky P, Moley KH. Leptin monotherapy rescues spermatogenesis in male akita type 1 diabetic mice. *Endocrinology.* 2014; 155: 2781-2786.
- Sefidgari-Abrasi S, Karimi P, Roshangar L, Morshedi M, Bavafa-Valenlia K, Saghafi-Asl M , ve ark. Lactobacillus plantarum and inulin: Therapeutic agents to enhance cardiac ob receptor expression and suppress cardiac apoptosis in type 2 diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2020; 2020: 4745389.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6: a018713.
- Sheikh Hosseini S, Gol A, Khaleghi M. The effects of the lactobacillus acidophilus atcc 4356 on the oxidative stress of reproductive system in diabetic male rats. *Int J Reprod Biomed.* 2019; 17: 493-502.
- Shin HS, Park SY, Lee DK, Kim SA, An HM, Kim JR , ve ark. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed bifidobacterium longum isolated from healthy adult koreans in high cholesterol fed rats. *Arch Pharm Res.* 2010; 33: 1425-1431.

- Shubhada S, Glinz M, Lamb DJ. Sertoli cell secreted growth factor. Cellular origin, paracrine and endocrine regulation of secretion. *Journal of andrology*. 1993; 14: 99-109.
- Sibuh BZ, Quazi S, Panday H, Parashar R, Jha NK, Mathur R , ve ark. The emerging role of epigenetics in metabolism and endocrinology. *Biology (Basel)*. 2023; 12.
- Siciliano RA, Reale A, Mazzeo MF, Morandi S, Silvetti T, Brasca M. Paraprobiotics: A new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*. 2021; 13.
- Simmons KM, Michels AW. Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J Diabetes*. 2015; 6: 380-390.
- Singh R, Chandel S, Dey D, Ghosh A, Roy S, Ravichandiran V , ve ark. Epigenetic modification and therapeutic targets of diabetes mellitus. *Bioscience reports*. 2020; 40.
- Solgi T, Amiri I, Asl SS, Saidijam M, Seresht BM, Artimani T. Antiapoptotic and antioxidative effects of cerium oxide nanoparticles on the testicular tissues of streptozotocin-induced diabetic rats: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 2021; 19: 589-598.
- Song Y, Jiang Y, Shi L, He C, Zhang W, Xu Z , ve ark. Comprehensive analysis of key m5c modification-related genes in type 2 diabetes. *Front Genet*. 2022; 13: 1015879.
- Subrini J, Turner J. Y chromosome functions in mammalian spermatogenesis. *Elife*. 2021; 10.
- Sun J, Chen H, Qiao Y, Liu G, Leng C, Zhang Y , ve ark. The nutrient requirements of lactobacillus rhamnosus gg and their application to fermented milk. *Journal of dairy science*. 2019; 102: 5971-5978.
- Süet SH, Malik, A., Sapra, A. . Histology, spermatogenesis. In. *StatPearls*; 2022.
- Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weissner J, Soder O. Endocrine disruptors and leydig cell function. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010.
- Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, Yamada N, Ishida T, Hosoda M , ve ark. Antidiabetic effect of lactobacillus gg in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67: 1421-1424.
- Tan SM, de Haan JB. Combating oxidative stress in diabetic complications with nrf2 activators: How much is too much? *Redox report : communications in free radical research*. 2014; 19: 107-117.
- Tao H, Shi P, Xuan HY, Ding XS. DNA methyltransferase-1 inactivation of androgen receptor axis triggers homocysteine induced cardiac fibroblast autophagy in diabetic cardiac fibrosis. *Arch Biochem Biophys*. 2020; 692: 108521.
- Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q , ve ark. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. *Front Nutr*. 2020; 7: 570344.
- Thomas MG, Avari P, Godsland IF, Lett AM, Reddy M, Oliver N. Optimizing type 1 diabetes after multiple daily injections and capillary blood monitoring: Pump or sensor first? A meta-analysis using pooled differences in outcome measures. *Diabetes Obes Metab*. 2021; 23: 2521-2528.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017; 474: 1823-1836.

- Tian Y, Song W, Xu D, Chen X, Li X, Zhao Y. Autophagy induced by ros aggravates testis oxidative damage in diabetes via breaking the feedforward loop linking p62 and nrf2. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020; 2020: 7156579.
- Titi-Lartey OA, Khan YS. Embryology, testicle. In *Statpearls*. Treasure Island (FL); 2023.
- Uysal F, Ozturk S, Akkoyunlu G. Dnmt1, dnmt3a and dnmt3b proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *J Mol Histol*. 2017; 48: 417-426.
- Vahamiko S, Laiho A, Lund R, Isolauri E, Salminen S, Laitinen K. The impact of probiotic supplementation during pregnancy on DNA methylation of obesity-related genes in mothers and their children. *Eur J Nutr*. 2019; 58: 367-377.
- Valcarce DG, Riesco MF, Martinez-Vazquez JM, Robles V. Long exposure to a diet supplemented with antioxidant and anti-inflammatory probiotics improves sperm quality and progeny survival in the zebrafish model. *Biomolecules*. 2019; 9.
- Veland N, Lu Y, Hardikar S, Gaddis S, Zeng Y, Liu B , ve ark. Dnmt3l facilitates DNA methylation partly by maintaining dnmt3a stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47: 152-167.
- Vilchez MC, Santangeli S, Maradonna F, Gioacchini G, Verdenelli C, Gallego V , ve ark. Effect of the probiotic lactobacillus rhamnosus on the expression of genes involved in european eel spermatogenesis. *Theriogenology*. 2015; 84: 1321-1331.
- Vinci MC, Polvani G, Pesce M. Epigenetic programming and risk: The birthplace of cardiovascular disease? *Stem Cell Rev Rep*. 2013; 9: 241-253.
- Vryer R, Saffery R. What's in a name? Context-dependent significance of 'global' methylation measures in human health and disease. *Clin Epigenetics*. 2017; 9: 2.
- Wagner IV, Kloting N, Savchuk I, Eifler L, Kulle A, Kralisch-Jacklein S , ve ark. Diabetes type 1 negatively influences leydig cell function in rats, which is partially reversible by insulin treatment. *Endocrinology*. 2021; 162.
- Wan HT, Mruk DD, Wong CK, Cheng CY. The apical es-btb-bm functional axis is an emerging target for toxicant-induced infertility. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 396-405.
- Wanda M. Haschek CGRvMAW. Male reproductive system. In. *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (Second Edition); 2010.
- Wang CH, Yen HR, Lu WL, Ho HH, Lin WY, Kuo YW , ve ark. Adjuvant probiotics of lactobacillus salivarius subsp. Salicinius ap-32, l. Johnsonii mh-68, and bifidobacterium animalis subsp. Lactis cp-9 attenuate glycemic levels and inflammatory cytokines in patients with type 1 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022a; 13: 754401.
- Wang JY, Ma D, Luo M, Tan YP, Ou Z, Tian G , ve ark. Effect of spermidine on ameliorating spermatogenic disorders in diabetic mice via regulating glycolysis pathway. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022b; 20: 45.
- Wang X, Zhang J, Liao Y, Jin Y, Yu X, Li H , ve ark. Dnmt1-mediated DNA methylation targets cdkn2b to promote the repair of retinal ganglion cells in streptozotocin-induced mongolian gerbils during diabetic retinopathy. *Comput Math Methods Med*. 2022c; 2022: 9212116.
- Wang Y, Dilidaxi D, Wu Y, Sailike J, Sun X, Nabi XH. Composite probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing glp-1 secretion in db/db mice. *Biomed Pharmacother*. 2020; 125: 109914.

- Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J , ve ark. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021; 9: 612285.
- Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding rnas as regulators in epigenetics (review). *Oncol Rep.* 2017; 37: 3-9.
- Westerik N, Kort R, Sybesma W, Reid G. *Lactobacillus rhamnosus* probiotic food as a tool for empowerment across the value chain in africa. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1501.
- WGO. Probiotics and prebiotics. 2017.
- Wong WJ, Khan YS. Histology, sertoli cell. In Statpearls. Treasure Island (FL); 2023.
- Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015; 8: 181-188.
- Xu F, Mao C, Ding Y, Rui C, Wu L, Shi A , ve ark. Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: Structures and targets for drugs. *Curr Med Chem.* 2010; 17: 4052-4071.
- Xu Q, Cheung RTF. Melatonin mitigates type 1 diabetes-aggravated cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Brain Behav.* 2023; 13: e3118.
- Yan F, Li N, Yue Y, Wang C, Zhao L, Evivie SE , ve ark. Screening for potential novel probiotics with dipeptidyl peptidase iv-inhibiting activity for type 2 diabetes attenuation in vitro and in vivo. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2855.
- Yi YS. Functional interplay between methyltransferases and inflammasomes in inflammatory responses and diseases. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- Yigitturk G, Acara AC, Erbas O, Oltulu F, Yavasoglu NUK, Uysal A , ve ark. The antioxidant role of agomelatine and gallic acid on oxidative stress in stz induced type i diabetic rat testes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2017; 87: 240-246.
- Yoshida S. From cyst to tubule: Innovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016; 5: 119-131.
- Yu D, Meng X, de Vos WM, Wu H, Fang X, Maiti AK. Implications of gut microbiota in complex human diseases. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- Zapata-Martin Del Campo CM, Martinez-Rosas M, Guarner-Lans V. Epigenetic programming of synthesis, release, and/or receptor expression of common mediators participating in the risk/resilience for comorbid stress-related disorders and coronary artery disease. *Int J Mol Sci.* 2018; 19.
- Zare Javid A, Aminzadeh M, Haghighi-Zadeh MH, Jamalvandi M. The effects of synbiotic supplementation on glycemic status, lipid profile, and biomarkers of oxidative stress in type 1 diabetic patients. A placebo-controlled, double-blind, randomized clinical trial. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020; 13: 607-617.
- Zarfeshani A, Khaza'ai H, Mohd Ali R, Hambali Z, Wahle KW, Mutalib MS. Effect of *Lactobacillus casei* on the production of pro-inflammatory markers in streptozotocin-induced diabetic rats. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2011; 3: 168-174.
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* gg decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in caco-2 cells. *J Nutr.* 2005; 135: 1752-1756.

- Zhang XT, Wang G, Ye LF, Pu Y, Li RT, Liang J , ve ark. Baicalin reversal of DNA hypermethylation-associated klotho suppression ameliorates renal injury in type 1 diabetic mouse model. *Cell Cycle*. 2020; 19: 3329-3347.
- Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 7493-7519.
- Zhao H, Wu H, Duan M, Liu R, Zhu Q, Zhang K , ve ark. Cinnamaldehyde improves metabolic functions in streptozotocin-induced diabetic mice by regulating gut microbiota. *Drug Des Devel Ther*. 2021; 15: 2339-2355.
- Zheng M, Zou C, Li M, Huang G, Gao Y, Liu H. Folic acid reduces tau phosphorylation by regulating pp2a methylation in streptozotocin-induced diabetic mice. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18.
- Zhou H, Hu H, Lai M. Non-coding rnas and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biol Cell*. 2010; 102: 645-655.
- Zullo A, Sommese L, Nicoletti G, Donatelli F, Mancini FP, Napoli C. Epigenetics and type 1 diabetes: Mechanisms and translational applications. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2017; 185: 85-93.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem Gamze	Uyruğu	
Soyadı	TAŞ DOĞAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Akdeniz Lisesi	2011
Lisans	Antalya Akdeniz Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Antalya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2018
Doktora	Antalya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2023

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil	77,50

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde <i>Lactobacillus Rhamnosus</i> GG Probiyotik Uygulamasının Testis Dokusunda DNA Metilasyonuna Etkisi	BAP	2022 - 2023
Normozoospermik ve Oligozoospermik Hastalarda İnsan Endojen Retroviral Syncytin Proteinleri ve Reseptörlerinin Araştırılması	BAP	2021 - 2022
Gebelik ve Laktasyon Dönemleri Boyunca Maternal Sirkadiyen Ritim Değişikliğinin, Erişkin Yavru Erkek Sıçanlardaki Davranış, Gonadal DNA Metilasyonu ve Transkriptomu Üzerindeki Transgenerasyonel Etkisi	TÜBİTAK-1001	2020 - 2023
Gebelik ve Laktasyon Süreçleri Boyunca Sirkadiyen Ritim Değişikliğinin Ovaryumda Hücre Proliferasyonu ve Apoptozu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	BAP	2019 - 2021
Prenatal Postnatal Sülfid Maruziyetinin Davranış ve Öğrenme Üzerine Etkilerinin ve Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması	BAP	2018 - 2020
Akut ve Kronik Dönem Elektromanyetik Radyasyon Uygulamasının Rat Testisinde Apoptoz ve JNK/p38 MAPK Sinyal Yolağı İlişkisinin Araştırılması	BAP	2018 - 2020
Maternal Sirkadiyen Ritim Değişikliğinin Testisteki DNA Metilasyonunda Transgenerasyonel Etkisi	BAP	2018 - 2020
Yaşlı Ratlarda L-Karnitin Presbiakuzi Üzerine Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarla Araştırılması	BAP	2017 - 2019
Kronik Deltametrin Uygulaması Sonrası Sirinjik Asidin Hipokampus ve Öğrenme Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	BAP	2017 - 2019

Fare embriyonik kök hücrelerinin endotelyal hücrelere farklılaşmasında <i>Ctcf</i> geninin rolü	BAP	2016 - 2018
Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destekleme Programı (Akdeniz Üniversitesi Avifaunası'nın Belirlenmesi)	TÜBİTAK-2209	2013 - 2014

Burslar-Ödüller:

- 1- TÜBİTAK 2250 Performans Programı Lisansüstü Bursu – 2022 / 2023
- 2- Uluslararası Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Poster 3.lük ödülü – 2022
- 3- TÜBİTAK 1001 Araştırmacı Bursu – 2021 / 2023
- 4- TÜBİTAK 2224-B Bilimsel Etkinliklere Katılım Bursu – 2016
- 5- Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Fakülte İkinciliği Ve Bölüm Birinciliği Yüksek Onur Ödülleri – 2015
- 6- Türk Eğitim Vakfı (TEV) Yükseköğrenim Başarı Ödülü – 2015
- 7- Türk Eğitim Vakfı (TEV) Yükseköğrenim Üstün Başarı Bursu – 2014 / 2015
- 8- TÜBİTAK 2209-A Araştırmacı Bursu – 2013

Yayınlar ve Bildiriler:

Bildiriler

Uluslararası kongre bildirileri:

1. **Gizem Gamze Tas**, Gamze Zengin, Leyla Sati. Transgenerational effects of maternal circadian rhythm changes on DNA methylation pattern in the testis of offspring rats. 38th European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 3-6 July 2022, Milan (Italy).
2. Leyla Sati, **Gizem Gamze Tas**, Gamze Zengin, Utku Cakmakli, Tugberk Denizalti, Pinar Sahin, Narin Derin. Transgenerational epigenetic influences of maternal circadian rhythm changes during pregnancy and lactation periods on cognition and behavior in male offspring. 38th European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 3-6 July 2022, Milan (Italy).
3. **Gizem Gamze Tas**, Gamze Zengin, Leyla Sati. Circadian rhythm changes are associated with DNA methylating enzymes and global DNA methylation in maternal ovary. 1. International Congress of Histology and Embryology, Niche. 26-28 May 2022, Turkey.
4. Leyla Sati, **Gizem Gamze Tas**, Bikem Soygur, Hakan Er. Stress-induced JNK/p38 MAPK signaling in rat testis after acute and chronic exposure to 2100 MHz radio frequency radiation. 1. International Congress of Histology and Embryology, Niche. 26-28 May 2022, Turkey.
5. Merve Gorgulu, Gamze Zengin, **Gizem Gamze Tas**, Leyla Sati. Stress-activated JNK/p38 MAPK Signaling and Circadian Rhythm Changes in the Maternal Ovary During Pregnancy and Lactation Periods. 1. International Congress of Histology and Embryology, Niche. 26-28 May 2022, Turkey.
6. Guven Akcay, Eren Ögüt, **Gizem Gamze Tas**, Leyla Sati, Fatos Belgin Yildirim, Narin Derin. The effects of deltamethrin and syringic acid on brainstem evoked auditory potentials. 26. International Symposium on Morphological Sciences. 5-7 July 2018, Prague, Czech Republic

7. **Gizem Gamze Tas**, Kubra Aksu, Nuray Acar Aydemir, Leyla Sati. The expression and localization of KIF17 in mouse uteri and implantation sites during peri-implantation period. 26. International Symposium on Morphological Sciences. July 5-7, Prague, Czech Republic.
8. **Gizem Gamze Tas**, Guven Akcay, Betul Danisman, Narin Derin, Leyla Sati, Alper Tunga Derin. Effect Of L-Carnitine Supplementation On Apoptosis In The Cochlea Of Aged Rats. 26. International Symposium on Morphological Sciences. July 5-7, Prague, Czech Republic.
9. Leyla Sati, **Gizem Gamze Tas**, Kubra Aksu, Nuray Acar Aydemir. CTCFL expression in mouse uteri and implantation sites during the peri-implantation period. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 26-28 Nisan 2018, Sofia (Bulgaria).
10. Leyla Sati, **Gizem Gamze Tas**, Bikem Soygur. Endogenous retroviral protein syncytin 2 receptor, MFSD2, is present in human sperm. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 26-28 Nisan 2018, Sofia (Bulgaria).
11. Leyla Sati, **Gizem Gamze Tas**, Bikem Soygur, Ozlem Babacan. Expression of endogenous retroviral protein Syncytin 2 in spermatozoa from normozoospermic and oligozoospermic men. II. International Expermed Congress, Expert Meeting on Personalized Reproductive Medicine. 27-30 April 2017, Kyrenia, Cyprus.
12. Leyla Sati, Nilay Kescu, **Gizem Gamze Tas**, Bikem Soygur, Ciler Celik-Ozenci. Comparison of the expression and localization of FoxO3 in normal term and gestational diabetic placentas. 13th Multinational Congress on Microscopy, 24-29 September 2017, Rovinj, Croatia.

Ulusal kongre bildirileri:

1. **Gizem Gamze Taş**, Gamze Zengin, Leyla Satı. Gebelik ve Laktasyon Süreçleri Boyunca Sirkadiyen Ritim Değişikliği ile Maternal Ovaryumdaki Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz İlişkisi. 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Kongresi.17-19 Mart 2022, Online.
2. Gamze Zengin, **Gizem Gamze Taş**, Leyla Satı. Maternal Sirkadiyen Ritim Değişikliğinin Erişkin Yavru Ovaryum Dokularında Hücre Proliferasyonu ve Apoptozu Üzerine Epigenetik Etkilerinin Araştırılması. 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Kongresi. 17-19 Mart 2022, Online.
3. **Gizem Gamze Taş**, Bikem Soygür, Hakan Er, Leyla Satı. Akut ve kronik dönem 2100 MHz elektromanyetik radyasyon uygulamasının rat testisi üzerindeki etkisi. 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (EMK). 24-26 Nisan 2019, Edirne.
4. Leyla Satı, **Gizem Gamze Taş**, Özlem Babacan, Ceren Kencebay Manas, Betül Danışman, Güven Akçay, Narin Derin. Prenatal, postnatal sülfite maruziyetinin, ratlarda hipokampus glutamat reseptör ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması. Uluslararası katılımlı 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (EMK). 24-26 Nisan 2019, Edirne.
5. Güven Akçay, Betül Danışman, **Gizem Gamze Taş**, Leyla Satı, Narin Derin, Alper Tunga Derin. Uzun Dönem L-Karnitin Tedavisinin Presbiakuzi Üzerinde Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi. 20-23 Mayıs 2018, İstanbul.
6. Leyla Satı, Bikem Soygür, **Gizem Gamze Taş**, Hakan Er, Piraye Yargıçoğlu. Akut ve kronik dönem 900 MHz elektromanyetik radyasyon uygulamasının rat testisi üzerindeki etkisi. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 10-13 Mayıs 2018, Antalya.
7. **Gizem Gamze Taş**, Leyla Satı, Özlem Babacan, Eren Öğüt, Rahime Şekerci, Fatoş Belgin Yıldırım. Kronik Deltametrin uygulaması sonrasında karaciğerde Sirinjik asitin koruyucu etkisinin araştırılması. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 10-13 Mayıs 2018, Antalya.
8. Esmâ Konuk, **Gizem Gamze Taş**, Aslı Özmen, Emin Türkay Korgun, Necdet Demir. Maternal diyabeti olan fetal testislerde Rapamisin uygulamasının Endoplazmik

Retikulum (ER) Stresi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme, İzmir.

9. **Gizem Gamze Tas**, Esmâ Konuk, Aslı Özmen, Emin Türkay Korgun, Necdet Demir. Maternal Diyabeti Olan Fetal Ovaryumlarda Rapamisin Uygulamasının Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme, İzmir.

MAKALELER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Hakan Er, **Gizem Gamze Tas**, Bikem Soygur, Sukru Ozen, Leyla Sati. Acute and Chronic Exposure to 900 MHz Radio Frequency Radiation Activates p38/JNK-mediated MAPK Pathway in Rat Testis. Reproductive Sciences. 29, 1471-1485 (2022).
2. **Gizem Gamze Tas**, Bikem Soygur, Leyla Sati. A Comprehensive Investigation Of Human Endogenous Retroviral Syncytin Proteins And Their Receptors In Men With Normozoospermia And Impaired Semen Quality. Journal Of Assisted Reproduction and Genetics. Journal Of Assisted Reproduction, (2022).
3. Hakan Er, Aysegül Gemici, **Gizem Gamze Tas**, Leyla Sati, Gamze Zengin, Süreyya Bilmen, Narin Derin, Sevim Ercan Kelek. Acetyl-L-carnitine attenuates chronic ethanol-induced oxidative stress, ER stress and apoptosis in rat gastric tissue. Alcohol. 112, 51-59 (2023).